

File copy

PTO 03-2447

Japanese Patent

Document No. 2000-60571

NOVEL MAMMAL PEPTIDE AND POLYNUCLEOTIDE FOR CODING THE SAME

[Shinki na Honyurui no Pepuchido Oyobi Sore o Kodo Suru

Porinukureochido]

Kiyomitsu Nara, Yuko Akasako, and Katsutaka Nagai

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Washington, D.C.

April 2003

Translated by: Schreiber Translations, Inc.

<u>Country</u>	:	Japan
<u>Document No.</u>	:	NOVEL MAMMAL PEPTIDE AND POLYNUCLEOTIDE FOR CODING THE SAME
<u>Document Type</u>	:	Kokai
<u>Language</u>	:	Japanese
<u>Inventor</u>	:	Kiyomitsu Nara, Yuko Akasako, and Katsutaka Nagai
<u>Applicant</u>	:	Mitsubishi Chemical Corp.
<u>IPC</u>	:	C 12 N 15/09 C 07 K 14/47 16/18 C 12 N 5/10 9/12 C 12 Q 1/02 //C 12 P 21/08 (C 12 N 15/08 C 12 R 1:91) (C 12 N 9/12 C 12 R 1:91)
<u>Application Date</u>	:	August 20, 1998
<u>Publication Date</u>	:	February 29, 2000
<u>Foreign Language Title</u>	:	Shinki na Honyurui no Pepuchido Oyobi Sore o Kodo Suru Porinukureochido
<u>English Title</u>	:	NOVEL MAMMAL PEPTIDE AND POLYNUCLEOTIDE FOR CODING THE SAME

(54): Title of the Invention: Novel mammalian peptide and polynucleotide for coding the same

(57) Summary

Objective: To provide a novel mammalian peptide which exhibits a phosphorylase activity.

Solution mechanism: A phosphorylase protein gene which exists in the hippocampus of the rat brain and which contributes to the transmission of sugar chain information is cloned for determining its DNA sequence as well as an amino acid sequence that can be estimated therefrom. The manifestation of said gene within an animal cell is induced for confirming the generation of said protein. An antibody for said protein, furthermore, was prepared.

Effects: The protein of the present invention exists most abundantly in the brain, and since it manifests most frequently at the fetal stage, it may be presumably to play a certain role in the construction of the brain, and therefore, it is useful for the treatments and diagnoses of cranial nerve diseases, etc.

Patent Claims

/2

¹ Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.

Claim 1

A mammalian peptide which includes the amino acid sequence expressed by Sequence No. 2 or an amino acid sequence wherein one or multiple amino acids of said amino acid sequence have been depleted, substituted, or inserted.

Claim 2

A mammalian peptide specified in Claim 1 which includes the amino acid sequence expressed by Sequence No. 2 or an amino acid sequence wherein one to several amino acids of said amino acid sequence have been depleted, substituted, or inserted.

Claim 3

A peptide specified in Claim 1 wherein said mammal is a rat.

Claim 4

A peptide specified in Claim 1 wherein said mammal is a mouse.

Claim 5

A peptide specified in Claim 1 wherein said mammal is a human.

Claim 6

A peptide specified in Claim 1 or 2 which includes the amino acid sequence expressed by Sequence No. 2.

Claim 7

A peptide specified in Claim 1 or 2 which exhibits a phosphorylase activity.

Claim 8

A peptide specified in Claim 7 which exhibits a serine-threonine phosphorylase activity.

Claim 9

A peptide specified in Claim 8 which is a kinase that possesses a proline-rich sequence PPXP and that is coupled with an SH3 domain.

Claim 10

An isolated polynucleotide which is at least 80% identical to a polynucleotide that codes a peptide which includes the amino acid sequence expressed by Sequence No. 2.

Claim 11

An isolated polynucleotide which codes the peptide specified in Claim 1 or 2.

Claim 12

An isolated polynucleotide specified in Claim 10 or 11 wherein said polynucleotide is a DNA.

Claim 13

An isolated polynucleotide specified in Claim 11 which possesses a DNA sequence expressed by base Nos. 205 ~ 1455 of Sequence No. 1.

Claim 14

An isolated polynucleotide which codes an amino acid identical to the amino acid of Sequence No. 2 based on the polycondensation of a genetic code.

Claim 15

An isolated polynucleotide specified in Claim 12 which includes the base sequence expressed by Sequence No. 1.

Claim 16

A reconstituted vector which includes the DNA specified in Claim 12.

Claim 17

A host cell which includes the reconstituted vector specified in Claim 16.

Claim 18

A method for manufacturing the peptide specified in Claim 1 or 2 wherein the host cell specified in Claim 17 is incubated for inducing the manifestation of the DNA specified in Claim 12 and for producing the peptide specified in Claim 1 or 2.

Claim 19

A medical drug which includes the peptide specified in Claim 1 or 2.

Claim 20

A medical drug which includes the polynucleotide specified in Claim 11.

Claim 21

An antibody for the peptide specified in Claim 1 or 2.

Claim 22

An antibody specified in Claim 21 which is a monoclonal antibody.

Claim 23

An antibody specified in Claim 21 which is a polyclonal antibody.

Claim 24

A diagnosing method with the following characteristics: In a method for diagnosing a disease related to the manifestation of the peptide specified in Claim 1 or 2, mutations within a polynucleotide which codes the mutant of said peptide are detected.

Claim 25

A method with the following characteristics: In a method for identifying a compound which hinders or boosts the activity of the peptide specified in Claim 1 or 2 based on its interaction with the same, a composition which includes said peptide is contacted with a compound targeted for screening under conditions where an interaction of said compound with said peptide becomes invoked and wherein the presence or absence of a signal attributed to the interaction of said compound is detected for identifying the compound that hinders or boosts the activity of the peptide specified in Claim 1 or 2.

Detailed explanation of the invention

[0001]

(Technical fields to which the invention belongs)

The present invention concerns a mammalian peptide which exhibits a novel physiological activity, and in particular, it

concerns a peptide which exhibits a phosphorylase activity (e.g., serine-threonine phosphorylase activity, etc.).

[0002]

(Prior art)

Diverse phosphorylases are operative in the brain and play important roles in the growths of memory and nerve cells or neuroglia cells, extensions of their peripherals, constructions of nervous circuit networks, etc. In recent years, the contributions of phosphorolysis to the transmission of sugar chain information have been clarified. It is known, furthermore, that such pathological cases as brain tumor, dementia, etc. are observed if the phosphorylases related to such activities become abnormal. For these reasons, attempts have been made to discover novel phosphorylases and to investigate their properties for analyzing their neurological functions and/or for clarifying the pathological mechanisms of nerve diseases in the hope of diagnosing and treating them.

[0003]

(Problems to be solved by the invention)

The present invention concerns a novel peptide which exhibits a useful physiological activity, a polynucleotide (e.g., DNA, etc.) which codes said peptide, a reconstituted vector which includes said DNA, a host which includes said reconstituted vector, a method for manufacturing said peptide based on

reconstituted DNA technology, an antibody for said peptide, a medical drug which includes said peptide or polynucleotide, a method for diagnosing diseases related to said peptide wherein mutations within the DNA that codes said peptide are detected, and a method for identifying a compound which activates or hinders said peptide.

[0004]

(Mechanism for solving the problems)

The present inventors compiled exhaustive research for the purpose of solving the /3 aforementioned problems and proceeded to amplify and clone a phosphorylase gene which exists in the hippocampus of the rat brain based on the PCR method; after a polynucleotide sequence that codes said gene had been determined, an amino acid sequence deduced from it was determined, and the generation of said protein was confirmed by inducing the manifestation of said gene, based on which the present invention has become completed.

[0005]

In other words, the present invention concerns (1): A mammalian peptide which includes the amino acid sequence expressed by Sequence No. 2 or an amino acid sequence wherein one or multiple amino acids of said amino acid sequence have been depleted, substituted, or inserted; (2): A mammalian peptide specified in Embodiment 1 which includes the amino acid sequence expressed by Sequence No. 2 or an amino acid sequence wherein one

to several amino acids of said amino acid sequence have been depleted, substituted, or inserted; (3): A peptide specified in Embodiment 1 wherein said mammal is a rat;

[0006]

(4): A peptide specified in Embodiment 1 wherein said mammal is a mouse; (5): A peptide specified in Embodiment 1 wherein said mammal is a human; (6): A peptide specified in Embodiment 1 or 2 which includes the amino acid sequence expressed by Sequence No. 2; (7): A peptide specified in Embodiment 1 or 2 which exhibits a phosphorylase activity; (8): A peptide specified in Embodiment 7 which exhibits a serine-threonine phosphorylase activity; (9): A peptide specified in Embodiment 8 which is a kinase that possesses a proline-rich sequence PPXP and that is coupled with an SH3 domain;

[0007]

(10): An isolated polynucleotide which is at least 80% identical to a polynucleotide that codes a peptide which includes the amino acid sequence expressed by Sequence No. 2; (11): An isolated polynucleotide which codes the peptide specified in Embodiment 1 or 2; (12): An isolated polynucleotide specified in Embodiment 10 or 11 wherein said polynucleotide is a DNA; (13): An isolated polynucleotide specified in Embodiment 11 which possesses a DNA sequence expressed by base Nos. 205 ~ 1455 of Sequence No. 1; (14): An isolated polynucleotide which codes an amino acid identical to the amino acid of Sequence No. 2 based on the polycondensation of a genetic code;

[0008]

(15): An isolated polynucleotide specified in Embodiment 12 which includes the base sequence expressed by Sequence No. 1; (16): A reconstituted vector which includes the DNA specified in Embodiment 12; (17): A host cell which includes the reconstituted vector specified in Embodiment 16; (18): A method for manufacturing the peptide specified in Embodiment 1 or 2 wherein the host cell specified in Embodiment 17 is incubated for inducing the manifestation of the DNA specified in Embodiment 12 and for producing the peptide specified in Embodiment 1 or 2; (19): A medical drug which includes the peptide specified in Embodiment 1 or 2; (20): A medical drug which includes the polynucleotide specified in Embodiment 11;

[0009]

(21): An antibody for the peptide specified in Embodiment 1 or 2; (22): An antibody specified in Embodiment 21 which is a monoclonal antibody; (23): An antibody specified in Embodiment 21 which is a polyclonal antibody; (24): A diagnosing method with the following characteristics: In a method for diagnosing a disease related to the manifestation of the peptide specified in Embodiment 1 or 2, mutations within a polynucleotide which codes the mutant of said peptide are detected; and

[0010]

(25): A method with the following characteristics: In a method for identifying a compound which hinders or boosts the activity of the peptide specified in Embodiment 1 or 2 based on

its interaction with the same, a composition which includes said peptide is contacted with a compound targeted for screening under conditions where an interaction of said compound with said peptide becomes invoked and wherein the presence or absence of a signal attributed to the interaction of said compound is detected for identifying the compound that hinders or boosts the activity of the peptide specified in Embodiment 1 or 2.

[0011]

The peptide of the present invention is a peptide which possesses an amino acid sequence which is totally or virtually identical to the amino acid sequence expressed by Sequence No. 2. Such a peptide which possesses an amino acid sequence which is totally or virtually identical to the amino acid sequence expressed by Sequence No. 2 is at least approximately 70%, more preferably at least approximately 80%, more preferably at least approximately 90%, or most preferably at least 95%, identical to the amino acid sequence expressed by Sequence No. 2, and it is endowed with an activity similar to that of the peptide expressed by Sequence No. 2. Such an activity may, for example, be instantiated by phosphorylase activities (kinase activities) such as the serine-threonine phosphorylase activity, etc. The magnitude of said activity is variable depending on the amino acid sequence of the peptide, although the amino acid sequence may be safely varied so long as such a biological activity remains useful.

[0012]

More specifically, the peptide of the present invention includes a fragment and/or analog of a peptide which possesses an amino acid sequence wherein 1 or multiple, more preferably 1 ~ 10, more preferably 1 ~ 5, or most preferably 1, 2, 3, or 4, members of the amino acid sequence expressed by Sequence No. 2 have been depleted, substituted, or inserted. Such a fragment and/or analog can be obtained by deleting, substituting, or inserting amino acids of sites which are non-essential to the functions of the peptide of the present invention. Amino acids of sites which are essential to the functions of the peptide, however, cannot be substituted. In consideration of its biological activity, furthermore, sites which contribute to the preservation of the overall peptide morphology cannot be modified by means of the deletions, substitutions, or insertions of amino acids. Substitutable amino acids are characterized by identical sizes or polarities. These cases are instantiated by reciprocal substitutions among aliphatic amino acid Ala, Val, Leu, and Ile, reciprocal substitutions between a hydroxyl group-containing Ser and Thr, reciprocal substitutions between an acidic residue-containing Asp and Glu, substitutions between an amido residue-containing Asn and Gln, substitutions between a basic residue-containing Lys and Arg, and substitutions between an aromatic residue-containing Phe and Tyr.

[0013]

Precursors of the peptide of the present invention, too, qualify as the peptide of the present invention so long as they

exhibit the aforementioned physiological activity. Such a precursor can be obtained by adding at least one amino acid to the N terminal side and/or C terminal side of the peptide of the present invention. The peptide of the present invention may, furthermore, be coupled with polyethylene glycol for the purpose of prolonging its half life or may instead be coupled with a secretion sequence or reader sequence for facilitating secretion, and furthermore, a fused peptide may be generated for purifying purposes. Physiologically permissible acid added salts of the /4

peptide of the present invention or its precursor are also within the scope of the present invention. Such acid added salts are instantiated by salts with inorganic acids such as hydrochloric acid, phosphoric acid, sulfuric acid, etc. and organic acids such as acetic acid, formic acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, citric acid, tartaric acid, malic acid, benzoic acid, benzenesulfonic acid, etc.

[0014]

The peptide and polynucleotide of the present invention are morphologically isolated, and it is desirable for them to be purified and sufficiently homogenized. It is desirable for the polynucleotide of the present invention to be at least 80% identical to the polynucleotide that codes the peptide which includes the amino acid sequence expressed by Sequence No. 2 (base Nos. 205 ~ 1455 of Sequence No. 1) while being complementary to the latter. A polynucleotide which is at least 90% identical is

more desirable, and one that is at least 95% identical is the most desirable. A polynucleotide which possesses a sequence that is at least 95%, preferably at least 97%, identical becomes hybridized with the aforementioned polynucleotide of Sequence No. 2 even under severe conditions.

[0015]

Fragments of the peptide of the present invention which are peculiarly characterized structurally or functionally are also useful. The peptide of the present invention is constituted by amino acids with a total length of 417, and it possesses a sequence peculiar to serine-threonine kinase and a protein-rich sequence [as well as a] PPXP sequence. Since it is a kinase coupled with the SH3 domain, useful fragments are instantiated by fragments which possess sequences peculiar to serine-threonine kinase and ones which possess protein-rich sequential PPXP sequences. Polynucleotides which code the aforementioned fragments are also within the scope of the present invention. Such polynucleotide fragments and polynucleotides which can be hybridized with polynucleotides that code said fragments are useful as PCR primers or as probes for detecting the DNAa that code the peptide of the present invention.

[0016]

(Application embodiments of the invention)

The DNA which codes the peptide of the present invention may, for example, be cloned from a cDNA library obtained as a result of

the countertransference of poly (A) ³H RNA derived from the rat brain. More specifically, the objective DNA is amplified from the aforementioned rat hippocampus cDNA library, etc. based on the PCR method by using a synthetic DNA primer which possesses a partial DNA base sequence that codes the peptide of the present invention, and it is then sub-cloned into a vector. A novel clone is selected, and its DNA sequence is determined. A total-length cDNA is cloned by using a primer which has been synthesized based on this sequence.

[0017]

It is also possible to clone the DNA that codes the peptide of the present invention by using a probe obtained by marking a DNA fragment or synthetic oligonucleotide that codes the total or partial region of the peptide (protein) of the present invention from a DNA which has been integrated with an appropriate vector. In a case where the poly (A) ³H RNA is prepared from a cell, the total RNA is first extracted, and said total RNA is then purified by using a poly (A) ³H RNA purification carrier (e.g., oligo (dT) cellulose, etc.). The method for preparing the total RNA is favorably instantiated by the guanidine thiocyanate-phenol method, guanidine thiocyanate-trifluorocesium method, alkali sucrose density gradient centrifugal separation method, and a method which uses guanidine thiocyanate and cesium chloride.

[0018]

A single-strand cDNA may, for example, be synthesized from a countertransference enzyme by using the poly (A) ³H RNA obtained

above as a matrix under the co-pervasion of 6 base random oligonucleotide as a primer, and a double-strand cDNA is subsequently synthesized by using DNA polymerase. The obtained DNA of approximately 200 bp is severed by using restriction enzymes EcoRI and XhoI, and after it has been sub-cloned on a pBluescriptII SK vector, the obtained DNA is transformed into *Escherichia coli*. The transformation [into] the *Escherichia coli* can be efficiently executed by using Hanahan's method (J. Mol. Biol., 166, 557-580). A plasmid DNA is purified from the obtained 100 clones based on the miniprep plasmid purification method (Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989), refer to 1.25), and after the DNA sequence has been determined, a single novel clone is selected. A total-length DNA is synthesized by using a primer which has been synthesized based on the sequence of this clone.

[0019]

A polynucleotide that codes the depletion-type, substitution-type, or insertion-type mutant which possesses an amino acid sequence wherein one or several (1 ~ several) amino acids of the amino acid sequence expressed by Sequence No. 2 have been depleted, substituted, or inserted can be synthesized with ease from a polynucleotide that codes the amino acid sequence expressed by Sequence No. 2 based on a conventionally-known in vitro mutation induction method. A polynucleotide that codes the depletion-type, substitution-type, or insertion-type mutant which

possesses an amino acid sequence wherein 1 ~ several amino acids of the amino acid sequence expressed by Sequence No. 2 have been depleted, substituted, or inserted can, for example, be synthesized with ease by using a conventionally-known kit [e.g., Mutan TM-K (manufactured by Takara Shuzo Co.)], Mutan TM-G (manufactured by Takara Shuzo Co.), etc.]. The manifest phosphorylase activity exhibited by the mutant of the peptide of the amino acid sequence expressed by Sequence No. 2 can, furthermore, be easily detected, and accordingly, the scope of the peptide of the present invention can be easily determined.

[0020]

A reconstituted vector which includes the polynucleotide of the present invention is used for generating the peptide of the present invention. Ones which are suitable for the preservation, propagation, and/or manifestation of the polynucleotide within a host cell are used as the vector of the present invention. The cloned DNA that codes the peptide of the present invention is inserted into the vector either directly or after having been digested with a restriction enzyme or added to /5 a linker. Said DNA possesses a translation initialization codon (ATG) on its 5' terminal side and a translation termination codon (TAA, TGA, or TAG) on its 3' terminal side. Said DNA is located on the lower stream side of the promoter within the manifestation vector. Concrete examples of usable vectors include plasmids [e.g., plasmids originating from Escherichia coli (e.g., pBR322, pBR325, pUC12, etc.), plasmids originating from Bacillus subtilis

(pUB110 and pC194), plasmids originating from *Spreptomyces* bacteria, plasmids originating from *Salmonella* bacteria, etc.], plasmids originating from yeast episomes or host chromosome elements (e.g., YCp-type plasmid, pYAC-type plasmid, etc.), bacteriophages (e.g., λ phage, etc.), vectors originating from viruses (e.g., vacciniavirus, adenovirus, retrovirus, vaccuovirus, etc.), etc. Many of these vectors are commercially available.

[0021]

The DNA sequences within a reconstituted vector are linked in such a way that they can be exerted on an appropriate manifestation control sequence (promoter). Such promoters are instantiated by phage λP_L promoter, T7 promoter, lac, trp, lpp, and tac promoters of *Escherichia coli*, SPO1 promoters of *Bacillus* bacteria, penP promoter, PHO5 promoter, PGK promoter, GAP promoter, ADH1 promoter, SUC2 promoter, GAL4 promoter, and Mf α promoter of yeasts, multangular promoters of insect cells, P10 promoter, SV40 initial- and late-phase promoters for animal cells, LTR promoter, CMV promoter, HSV-TK promoter, and metallothionein promoter of retroviruses, S5S promoters for plant cells, ineactin gene promoter, etc. A given reconstituted vector includes a DNA region to be transferred, transfer initialization and transfer conclusion signal sequences, and at least one gene.

[0022]

Generally speaking, a given manifestation vector includes repressor coupling sites and manifestation control regions which

can be activated by enhancers, etc. The manifestation vector additionally includes a selection marker. Favorable markers are instantiated by a dihydrofolic acid reductase (dhfr) gene and a neomycin-resistant gene for eukaryote cells, tetracycline- or ampicillin-resistant genes for germs, etc. The dhfr gene confers mesothoraxate resistance on transformed cells, whereas the neomycin-resistant gene confers G418 resistance on transformed cells. In a case where a dhfr gene-depleted CHO cell is designated as a host and where the dhfr gene is designated as a selection marker, transformants can be selected within a medium which includes no thymidine. In this case, not only the dhfr gene but also the DNA that codes the peptide of the present invention become simultaneously amplified within the cell by gradually elevating the mesothoraxate (MTX) concentration and by then selecting a resistant strain, based on which a CHO (dhfr⁻) cell of a high manifestation probability can be obtained.

[0023]

The reconstituted vector of the present invention may, if necessary, be constructed in such a way that it will add a signal sequence to the N terminal side of the peptide. Such signal sequences coincide with PhoA and OmpA signal sequences, etc. in the cases of Escherichia coli hosts, such signal sequences as Mf α , SUC2, etc. in the cases of yeast hosts, and α -interferron signal sequences, etc. in the cases of animal cell hosts. The present invention also concerns a host cell which includes the aforementioned reconstituted vector(s). These host cells are

instantiated by eukaryote cells such as mammalian cells, plant cells, insect cells, yeast cells, eukaryote cells (e.g., *Aspergillus* bacteria, etc.), and prokaryote cells (e.g., germ cells, etc.). The reconstituted vector of the present invention becomes introduced to the host cell based on such methods as calcium phosphate transfection, electroporation, transduction, infection, etc.

[0024]

The manifestation of the peptide of the present invention can be induced within the aforementioned hosts of mammalian cells, yeasts, germs, etc. under the control of the aforementioned promoter(s). Prokaryote hosts are instantiated by *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella* bacteria, *Pseudomonas*, *Spreptomyces*, *Staphylococcus*, etc. Yeasts are instantiated by *Saccharomyces servazzii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Piquia pastris*, etc.

[0025]

Transformed prokaryote hosts are propagated, and in the case of a vector which includes an induction-abled promoter, the induction is executed based on the temperature or a chemical induction substance, and said cells are incubated within a liquid medium which includes a carbon source (e.g., glucose, dextran, soluble starch, etc.), a nitrogen source (e.g., ammonium salt, nitrate, peptone, casein, meat extract, soybean extraction residue, etc.), and an inorganic matter(s) (e.g., calcium chloride, sodium dihydrogen phosphate, magnesium chloride, etc.)

within an appropriate pH range (pH: Approximately 5 ~ 8) over an appropriate period (approximately 3 ~ 24 hours). Incubation temperature ranges suitable respectively for *Escherichia coli* and *Bacillus* bacteria coincide with approximately 14 ~ 43°C and approximately 30 ~ 40°C. After the incubation has been completed, the cells are broken by physical or chemical means, and the peptide of the present invention becomes purified from the obtained crude extract.

[0026]

The transformed yeast is incubated within a medium (e.g., minimal medium, etc.) within a pH range of approximately 5 ~ 8 and within a temperature range of approximately 20 ~ 35°C for approximately 24 ~ 72 hours. As far as insect cells are concerned, in a case where AcNPV (*Autographa californica* NPV) is selected as a virus, Sf cells, MG1 cells, etc. are used, whereas in a case where the silkworm polynuclear disease virus (BmPV) is selected as a virus, silkworm larvae, silkworm incubation cells (BM-N cell), etc. are used. The silkworm cells are intergenerationally incubated after having become confluent at approximately 27°C by using a TC-10 medium which includes 10% of a thermally deactivated bovine fetal serum, etc.

[0027]

Mammalian cells are instantiated by the COS-7 cell, mouse AtT-20 cell, rat GH3 cell, rat MtT cell, mouse MIN6 cell, Vero cell, C127 cell, CHO cell, dhfr gene-depleted CHO cell, HeLa cell, L cell, BHK cell, BALB3T3 cell, 293 cell, Bouze melanoma cells,

etc. Mammalian cell manifestation vectors are instantiated by duplicated origination points, promoters (e.g., aforementioned SV40 initial- and late-phase promoters and LTR promoter, CMV promoter, /6 HSV-TK promoter, metallothionein promoter, etc. for retroviruses), enhancers (e.g., SV40 enhancer, adenovirus enhancer, cytomegalovirus initial promoter, etc.), selection markers (e.g., aforementioned dhfr gene, neomycin-resistant gene, etc.), ribosome-coupled sites, polyadenylated sites (e.g., SV40 polyadenylated site, etc.), splice donor and acceptor sites (e.g., DNA sequence originating from SV40-spliced site), transfer conclusion sequences, and 5' non-transfer sequences.

[0028]

Plasmid vectors, single-strand or double-strand phage vectors, single-strand or double-strand RNA or DNA virus vectors, etc. can be used as such vectors. A MEM medium, DMEM medium, RPM11640 medium, etc. which each include approximately 5 ~ 20% of bovine fetal serum are used for incubating transformed mammalian cells, and the incubation is carried out within a pH range of approximately 6 ~ 8 and within a temperature range of approximately 30 ~ 40°C for approximately 15 ~ 72 hours.

[0029]

In a case where the gene that codes the peptide of the present invention is introduced to a plant cell, the Ti plasmid, which exists in Agrobacterium tumefaciens, can be used. Genes originating from foreign sources are inserted into 25 bp

repetitive sequences located at both terminals of the T-DNA of the Ti plasmid. The Ri plasmid of A. rhizogenes can likewise be used. In a case where the T-DNA is introduced into the plant cell, a gene group referred to as the "vir region" is essential. A single-strand DNA (T-strand) becomes generated from the T-DNA under the pervasion of the activated vir gene, and said gene becomes integrated with a chromosome within the plant cell. The targeted gene can be introduced into the Ti plasmid based on co-existent integration. Moreover, the Ti plasmid can be introduced to the Agrobacterium based on the Biliner method, wherein T-DNA and vir regions respectively exist above separate plasmids. Next, the plant is infected with the Agrobacterium that includes the targeted gene, based on which said gene becomes introduced to said plant.

[0030]

In a case where a mammalian cell is selected as a host, the peptide of the present invention can be recovered and purified from a reconstituted cell incubation product by means of ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, hydrophobic interactive chromatography, etc. The peptide of the present invention may or may not be glycosylated. Depending on hosts, furthermore, a peptide which possesses methionine at its N terminal may become obtained. The generation of the peptide of the present invention based on the aforementioned reconstituted DNA technology is mentioned in detail in Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd

Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

[0031]

In the context of generating a monoclonal antibody specific to the peptide of the present invention, the peptide of the present invention is administered to a warm-blooded animal (e.g., mice, rats, etc.) together with a carrier and a diluent. It is desirable to administer Freund's complete adjuvants or Freund's incomplete adjuvants concomitantly for the purpose of upgrading the antibody generation capacity. Under normal circumstances, the peptide is administered on a total of approximately 2 to 10 occasions at a frequency of once every 2 ~ 6 cycles [sic: Presumably "weeks"]. In the context of preparing a monoclonal antibody generation cell, an individual(s) with regard to an antibody-specific value has been acknowledged is selected from among the antigen-inoculated warm-blooded animals, and after 2 ~ 5 days have elapsed since the final inoculation, its spleen or lymph node is harvested, followed by the fusion of an antibody generation cell included therein with myeloma, as a result of which a monoclonal antibody generation hybridomer becomes prepared. The aforementioned cell fusion operation can be carried out according to the dictates of Kohler and Milstein, Nature, 256, 495 (1975). Polyethylene glycol (PEG) is desirable as a fusion accelerator, whereas P3U1 is desirable as a myeloma cell. It is desirable for the ratio between the number of antibody generation spleen cells and the number of myeloma cells used concomitantly to

be confined to a range of 1 : 1 ~ 20 : 1, whereas the PEG is added within a concentration range of approximately 10 ~ 80%, and a fused cell can be obtained as a result of incubation at 30 ~ 37°C for 1 ~ 10 min. The screening of the monoclonal antibody generation hybridomer and the purification of the monoclonal antibody can be carried out based on conventionally-known methods.

[0032]

The monoclonal antibodies of the present invention also include a chimera antibody, single-strand antibody, human antibody, Fab fragment, etc. Polyclonal antibodies, too, can be prepared based on conventionally-known methods. In other words, a complex of the peptide of the present invention and a carrier protein is prepared, and after a warm-blooded animal has been inoculated with it according to procedures similar to those of the aforementioned case of the monoclonal antibodies, the antibodies are separated and purified based on conventionally-known methods. Since the peptide of the present invention is presumed to contribute to the transmission of information within the brain, it can be used for the treatments of cranial nerve diseases. Substances which are capable of activating the peptide of the present invention are presumed to be useful for maintaining and/or boosting nerve activities.

[0033]

A compound capable of activating the peptide of the present invention can be identified according to the following procedures. In other words, conditions under which the interaction between a

compound targeted for screening and the peptide of the present invention can be invoked are established, and the interaction between such a candidate compound and the peptide of the present invention is invoked under the co-pervasion of a second component which is capable of providing a detectable signal in accordance with the interaction between said candidate compound and the peptide of the present invention, and whether said candidate compound hinders or boosts the activity of the peptide of the present invention is determined by detecting the presence or absence of a signal attributed to said interaction.

[0034]

A dosage of the peptide of the present invention effective for treatment may be administered to an individual that needs said peptide for the purpose of treating said individual.

[0035]

An effective dosage of an antagonist which hinders the activity or manifestation of the peptide of the present invention may, furthermore, be administered to an individual that needs the hindrance of said peptide for the purpose of treating said individual. Antagonists usable in this context are instantiated not only by monoclonal antibodies or polyclonal antibodies for the peptide of the present invention but also by antisense DNAs and antisense RNAs, which are /7 oligonucleotides which hinder the manifestation of the gene of the peptide of the present invention, as well as DNA constructs that generate antisense RNAs within organisms.

[0036]

The peptide of the present invention is administered orally in the forms of a tablet agent, capsule agent, elixir agent, microcapsule agent, etc. Since the peptide drug normally becomes decomposed within the stomach or small intestine, it is desirable to use a drug transportation system for avoiding decompositions within these organs in a case where it is administered orally. The peptide of the present invention may, furthermore, be administered non-orally in the form of an injection agent (e.g., sterile solution or suspension of water or another pharmaceutically permissible liquid, etc.).

[0037]

The medical drug of the present invention may also include conventionally-known carriers, scenting agents, molding agents, vehicles, preservatives, stabilizers, coupling agents, etc. Conventionally-known ones, too, can be used as the coupling agents, swelling agents, lubricants, sweeteners, scenting agents, etc. which are added to tablet agents, capsule agents, etc. The optimal administration dosage of the peptide of the present invention differs depending on the conditions of patients, ages of patients, presence or absence of simultaneously administered agents, administration paths, etc., although it is presumed to coincide with an ordinary peptide medical drug administration dosage range, namely 10 μ g/body weight ~ 8 mg/kg-body weight.

[0038]

Diseases related to the manifestation of the peptide of the present invention can be diagnosed by the cDNA or genom sequence difference between a diseased individual and a non-diseased individual. In a case where a mutation observed in the diseased individual cannot be observed in the normal individual, it is possible for said mutation to be a cause of the disease with which the peptide of the present invention is related. Since the gene anomaly of the aforementioned cDNA or mRNA can be detected, furthermore, the polynucleotide of the present invention or its fragment is useful for gene diagnoses in the context of diagnosing diseases ascribed to damages or mutations of said polynucleotide, its manifestation loss or gain, and/or its excessive manifestation. In a case where the polynucleotide of the present invention is used as a treatment drug or preventive drug, said polynucleotide can be administered by a conventionally-known method either alone or after having been inserted into a conventionally-known retrovirus vector, adenovirus vector, etc.

[0039]

(Application examples)

In the following, the present invention will be explained more concretely with reference to application examples, although the present invention is not limited to these application examples so long as its spirit is retained. The methods of the following application examples were implemented in compliance with the

standard methods mentioned in the aforementioned laboratory manual by Sambrook, et al. unless otherwise qualified.

[0040]

Application Example 1: Cloning of rat PKS gene

The peptide (hereafter abbreviated as the "PKS") of the present invention is characterized by an amino acid sequence corresponding to Sequence No. 2 of the sequence listing, and it is coded by the DNA sequence expressed by Sequence No. 1 of the sequence listing. The gene of the PKS may, for example, be obtained from the tissues of rat brains, etc. by means of genetic engineering, as shown below.

[0041]

More specifically, the brain was initially removed from a rat, and it was then homogenized within a solution which included 10 volume equivalents of guanidine thiocyanate (4 M guanidine thiocyanate; 0.1 M tris-hydrochloric acid; pH: 7.5) by using a Polytron homogenizer. After the DNA had been severed by using an injection syringe equipped with an 18 G injection needle, sodium laurylsarcosinate was added to it in such a way that the eventual concentration would be 0.5%, and after its layer had been formed above a CsCl-EDTA solution (5.7 M CsCl; 0.5 M EDTA; pH: 7.5), the resulting system was centrifugally separated at 25,000 rpm and at 20°C over a 24-hour period by using Hitachi Super Centrifugal Device RPS40 Rotor. The RNA which had become precipitated on the bottom of the centrifugal tube was solubilized into approximately

5 mL of a TES solution (0.1% SDS; 10 mM tris-[hydrochloric acid]; pH: 7.5; 1 mM EDTA) and then recovered. After a volume equivalent of a chloroform/isobutanol mixture (= 4 : 1) had been added to the obtained solution, impurities were removed from it, and subsequently, the RNA was precipitated by adding 1/10 equivalent of 3 M sodium acetate (pH: 5.2) and 2.5 equivalents of ethanol. After the precipitated RNA had been centrifugally recovered, its salt was removed by using 70% ethanol, and after the remainder had been dried at room temperature, a total RNA was obtained. The obtained total RNA was solubilized into 1 mL of a column load buffer (20 mM tris-hydrochloric acid; pH: 7.6; 0.5 M NaCl; 1 mM EDTA; 0.1% sodium laurylsarcosinate), and after the obtained solution had been subjected to an oligo dT cephalose equilibrated with a column load buffer, it was washed with 10 volume equivalents of a column load buffer for the purpose of removing impurities, and subsequently, it was eluted by using an elution buffer (10 mM tris-hydrochloric acid; pH: 7.6; 1 mM EDTA; 0.05% SDS), as a result of which mRNA was obtained. The mRNA obtained according to the aforementioned procedures may, for example, be purified by using Fast Track 2.0 mRNA Isolation Kit (manufactured by Invitrogen Co.) as well.

[0042]

After 1 μ g of the obtained mRNA had been solubilized into 11 μ L of water, 1 μ L of 6 base random oligonucleotide (50 ng/ μ L) was added to the obtained solution, and after the mixture had been heated at 70°C over a 10-min. period, it was cooled with ice over

a 1-min. period, and after 2 μ L of a 10 x first strand buffer (200 mM tris-hydrochloric acid; pH: 8.4; 500 mM KCl), 2 μ L of 25 mM $MgCl_2$, 2 μ L of 0.1 M dithiothreitol, 1 μ L of a 10 mM dNTP mixture (10 mM each of dATP, dGTP, dCTP, and dTTP), and 1 μ L of a countertransference enzyme (Super Script II, manufactured by GIBCO BRL Co.; 200 units/ μ L) were added to and reacted with it at 25°C over a 10-min. period and then at 42°C over a 50-min. period, as a result of which rat hippocampus cDNA became synthesized. The aforementioned cDNA was synthesized by using a kit provided by Life Technologies (Super Script Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis Kit).

[0043]

The cDNA of the PKS was obtained based on the polymerase chain reaction (PCR) method by using synthetic DNAs expressed respectively by Sequence Nos. 3 and 4 under the pervasion of the obtained cDNA as a matrix. First, 1 μ L of the rat brain cDNA obtained according to the aforementioned procedures, 2.5 μ L of 200 mM tris-hydrochloric acid (pH: 8.4; 500 mM KCl), /8 1.5 μ L of 25 mM $MgCl_2$, 0.5 μ L of a 10 mM dNTP mixture (10 mM each of dATP, dGTP, dCTP, and dTTP), 0.5 μ L each of the synthetic DNAs expressed respectively by the aforementioned Sequence Nos. 3 and 4 (100 pmole/ μ L), 0.25 μ L of Ampli Taq DNA Polymerase (5 units/ μ L) provided by Perkin Elmer Co., and 18.25 μ L of water were mutually mixed, and a cycle of 94°C/84 sec. \rightarrow 55°C/150 sec. \rightarrow 72°C/180 sec. was repeated 35 times, as a result of which approximately 200 bp of DNA became amplified. After this DNA had been severed by using

restriction enzymes EcoRI and XhoI, it was separated by means of agarose gel electrophoresis and then sub-cloned onto a pBluescript II SK vector which had been severed by using restriction enzymes EcoRI and XhoI. After the obtained DNA had been transformed into an Escherichia coli XL1-Blue MRF strain, 100 clones were obtained. After plasmid DNA had been prepared from this clone based on the miniprep plasmid purification method (small-scale plasmid DNA preparation method), the DNA sequences were determined by the Sanger method, as a result of which the inclusion of a novel sequence in one of them was acknowledged. Synthetic DNAs expressed respectively by Sequence Nos. 5 through 9 were prepared based on this sequence, and after a 5'-RACE (accelerated cDNA terminal amplification) treatment had been carried out by using the synthetic DNAs expressed respectively by Sequence Nos. 7 and 8, a cDNA fragment covering the entire open reading frame length was obtained, and its base sequence was determined, as a result of which the base sequence expressed by Sequence No. 1 was ascertained.

[0044]

It was likewise possible to obtain the nDNA of the PKA with ease in cases where the synthetic DNAs expressed respectively by Sequence Nos. 9 and 10, which had been synthesized based on the obtained base sequence, were used instead. In other words, by using Takara LA PCR Kit, 5 μ L/50 μ L of the 10 x LA PCR buffer, 400 μ M each of the respective dNTPs, 0.2 μ M of the respective synthetic DNAs, 1.25 U/25 μ L of TAKARA LAT aq, and 1 μ L of rat

hippocampus cDNA (approximately 30 ng) were subjected to a PCR reaction (5 cycles of 94°C/20 sec. → 72°C/3 min., 5 cycles of 94°C/20 sec. → 70°C/3 min., and 20 cycles of 94°C/20 sec. → 68°C/3 min.), as a result of which 1,500 bp of the cDNA of the PKS was obtained. After 50 ng of the obtained cDNA of the PKS had been severed by using restriction enzymes EcoRI and XhoI, it was linked, by using a TAKARA linking kit (Ligation Kit ver. 2), with 15 ng of a vector (e.g., pBlue script II SK-, manufactured by Stratagene Co.) which had likewise been severed by using restriction enzymes EcoRI and XhoI. After water had been added to the obtained DNA in such a way that the total volume would be 100 μ L, the obtained mixture was precipitated in ethanol by adding 1/2 equivalent of 7.5 M ammonium acetate and 2 equivalents of ethanol for purifying the linked DNA, and after it had then been solubilized into 2 μ L of water, it was introduced to an Escherichia coli XL1-Blue MRF strain which had been suspended in 20 μ L of water based on the electroporation method (0.1 cm gap; 300 ohm; 1.75 kV; 25 μ FD; BIO Rad Gene Pluser II) and then scattered within an LB-Aar medium which included 50 μ g/mL of ampicillin, as a result of which an Escherichia coli which included a plasmid DNA with which the cDNA of the PKS had become linked became grown. The plasmid DNA was purified from this Escherichia coli based on the miniprep method, as a result of which a plasmid vector which included the cDNA of the PKS was obtained. The sequence of this DNA was determined by the Sanger method.

[0045]

An animal cell manifestation system of the PKS was also engineered. The synthetic DNAs expressed respectively by Sequence Nos. 10 and 11 were subjected to a PCR reaction by using the cDNA of the PKS obtained according to the aforementioned procedures as a matrix, and after the obtained DNA fragment had been severed by using restriction enzymes EcoRI and XhoI, it was introduced to the animal cell manifestation vector pEGFP-C2 (manufactured by Clone Tech Co.), as a result of which the PKS animal cell manifestation vector pEGFP-C2PKS was obtained. After the obtained DNA had been purified, 20 μ g of the purified DNA was mixed with CHOP cells (number: 3×10^6) which had been suspended in 800 μ L of HeBS (20 mM Hepes; pH: 7.05; 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0.7 mM Na_2HPO_4 ; 6 mM dextrose), and the aforementioned DNA was introduced to the CHOP cell based on the electroporation method (0.4 cm gap; 0.38 kV; 960 μ FD; Bio Rad Gene Pluser II). The same cell was incubated over a 2-day period within a medium obtained by adding 10% of bovine fetal serum to α MEM, as a result of which the peptide of the present invention manifested within the cell in the form of a fused protein of jellyfish green fluorescent protein (GFP). The manifesting protein was verified at the position of 75 kDa (approximately 50 kDa of PKS + approximately 27 kDa of GFP) by means of a Western blotting method which used an anti-GFP antibody and an anti-PKS antibody).

[0046]

Techniques concerning the syntheses of the aforementioned mRNA, cDNA, and DNA as well as the reconstitutions of PCR and DNA are mentioned in the aforementioned laboratory manual by Sambrook, et al. A northern blotting operation was carried out for the purpose of investigating the mRNA content of the PKS. After the obtained cDNA had been labeled with ^{32}P by the random primer labeling method, mRNA samples were each prepared from the brains, hearts, spleens, lungs, livers, skeletal muscle[s,] kidneys, and testicles of mice, and when they were subjected to Northern blotting analyses, the mRNA of the PKS was determined to be most abundant in the brains and hearts, although it was also manifest in the livers, kidneys, testicles, and lungs. For this reason, the PKS is estimated to exhibit peculiar physiological effects in these organs. The manifest PKS contents in the rat brains, furthermore, were compared on the 14th day of the fetal period, 18th day of the fetal period, 7th day after birth, 14th day after birth, and 10th week after birth by means of Northern blotting analysis, as a result of which the mRNA content of the PKS was determined to be the highest on the 18th day of the fetal period. This period coincides with the period of the propagation and differentiation of the nerve cells and the extension of the nerve peripherals in the context of the formation of brains, and the possibility of certain functions being served by the PKS at these stages has been thus suggested. An antibody for the PKS, on the other hand, was prepared according to the following procedures. A 20 residue peptide corresponding to the 398 ~ 417th members of

Sequence No. 2 was synthesized, and after it had been conjugated
/9

with Keyhole Limpet Homocyanine, rabbits were inoculated with it. On the initial inoculation occasion, 0.4 mg of it was administered together with a Freund's complete adjuvant, and subsequently, 0.4 mg each of the same was hypodermically injected together with a Freund's incomplete adjuvant on the second and third occasions at a 1-month interval. The blood was sampled 10 days after the inoculation, and an anti-PKS serum was obtained. The rat brain homogenate of rat brains was subjected to Western blotting analysis by using this anti-serum, as a result of which it was determined that, since the anti-PKS serum was peculiarly coupled with a protein with a molecular weight of approximately 50 kDa, the molecular weight of the PKS within the rat organism is approximately 50 kDa. This molecular weight coincides with the molecular weight of the peptide expressed by Sequence No. 2.

[0047]

The peptide of the present invention shares sequential components common to the serine-threonine phosphorylase in the Gly as the 60th member of Sequence No. 2, Gly as the 62th member, Gly as the 65th member, Ala as the 71th member, Lys as the 73rd member, His-Asn as the 172nd through 170th members, Asp-Glu as the 194th through 196th members, and Asp-Gly as the 235th through 240th members, and therefore, it is presumed to be a serine-threonine phosphorylase. As for the PKS gene sequence of the mice, only the substitution of the Glu as the 254th member of

Sequence No. 2 with Lys, substitution of the Pro as the 340th member with Ser, and the substitution of the Ala as the 400th member with Thr were observed, and thus, the following are also within the scope of the present invention: A peptide which exhibits a serine-threonine physiological activity and which possesses the sequence expressed by Sequence No. 2, a mammalian peptide which possesses a sequence wherein at least one of such sequential members have been depleted, substituted, or inserted, and a DNA that codes the same.

[0048]

The protein of the present invention can be presumed to be a serine-threonine phosphorylase based on its sequence, and therefore, it is expected to be applied to medical drugs based on the search for phosphorolyzed substrates and the developments of inhibitors and activators for the phosphorylase activity. The mRNA of the PKS, furthermore, was most abundant in the brains and hearts, and it was also found in the livers, kidneys, testicles, and lungs, based on which it is expected to be utilized not only for the analyses and diagnoses of factors contributing to pathological states originating from these tissues but also for their treatments. The peptide of the present invention, furthermore, is expected to exert an effect of adjusting the central nerves, and therefore, it can also be used for the treatments of diseases related to neurological functions.

[0049]

(Effects of the invention)

The peptide of the present invention is a phosphorylase which manifests in the hippocampus and which contributes to the transmission of sugar chain information. This enzyme may be presumed to be a kinase coupled with the SH3 domain in that it possesses a sequence peculiar to serine-threonine kinase, a proline-rich sequence, and a PPXP sequence. This peptide was named "SH3-binding type protein kinase" (PKS). Northern blotting analysis revealed that the PKS was most abundant in the brain and that its manifestation probability was the highest during the fetal period, and therefore, the peptide of the present invention may be presumed to play a certain function(s) during the formation of the brains. The peptide of the present invention is therefore presumed to be useful for the treatments and diagnoses of cranial nerve diseases and diseases related to neurological functions. The substance which activates the peptide of the present invention, furthermore, is presumed to be useful for preserving and boosting nerve activities.

[0050]

[Sequence Listing]

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Chemical Corporation

<120> Novel mammalian peptide and polynucleotide coding therefor

<130> P98-0440

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1527

<212> DNA

<213> Wister Rat

<220>

<221> CDS

<222> (205) .. (1455)

<400> 1

/10

```
acagcgagat cctcttgcta          acgagaagcc gcgggcgccc caaagcctcg
ggacccgggc          60
gaccaaacc cttgcgacgc ctttcgcgtc cctgctcatg gtggtggtgg
tgccctgagc          120
ccctctcggg ccgggcagac gaagaccgac acggcgccca ggccccctgc
cgcggcgtcc          180
ccgcggcccc agcccaggga gaag atg agc gtg ggc tgc cct gag cct
gaa          231
```


Met Ser Val Gly

Cys Pro Glu Pro Glu

1

5

ccg ctc cac tcc ctg cct tgc tgt ggg ccg ggg gcc gcc cct
gta cct 279

Pro Leu His Ser Leu Pro Cys Cys Gly Pro Gly Ala Ala Pro Val Pro

10

15

20

25

ggg gca ggt gtg ccc ctc ctc aca gaa gac atg caa gcc
ctg acc ctg 327

Gly Ala Gly Val Pro Leu Leu Thr Glu Asp Met Gln Ala Leu Thr Leu

30

35

40

cgc aca ctg gct gcc agc gac gtc acc aag cac tac gag ctc
gtg cgg 375

Arg Thr Leu Ala Ala Ser Asp Val Thr Lys His Tyr Glu Leu Val Arg

45

50

55

gag ctg ggt aaa ggg acc tac ggg aag gtc gac ctg gtg gct
tac aag 423

Glu Leu Gly Lys Gly Thr Tyr Gly Lys Val Asp Leu Val Ala Tyr Lys

60

65

70

ggc aca ggc act aaa atg gcc ctg aaa ttt gtg aat aag
agt aag acc 471

40

Gly Thr Gly Thr Lys Met Ala Leu Lys Phe Val Asn Lys Ser Lys Thr

75

80

85

aag ctg aag aac ttc ctg cgt gag gtg agc atc acc aac agc
ctg tcg 519

Lys Leu Lys Asn Phe Leu Arg Glu Val Ser Ile Thr Asn Ser Leu Ser

90

95

100

105

tct agc ccc ttc atc atc aag gtc ttc gac gtg gtc ttc
gag acg gag 567

Ser Ser Pro Phe Ile Ile Lys Val Phe Asp Val Val Phe Glu Thr Glu

110

115

120

gag tgc tat gtc ttt gct cag gag tat gca cct gct ggg
gac ctg ttt 615

Glu Cys Tyr Val Phe Ala Gln Glu Tyr Ala Pro Ala Gly Asp Leu Phe

125

130

135

gac atc atc cct cct cag gtg ggg ctc ccg gag gac acg gtg
aag cgc 663

Asp Ile Ile Pro Pro Gln Val Gly Leu Pro Glu Asp Thr Val Lys Arg

140

145

150

tgt gtg cag cag ctg ggg ctg gca ctg gac ttc atg cat
agc agg cag 711

Cys Val Gln Gln Leu Gly Leu Ala Leu Asp Phe Met His Ser Arg Gln
 155 160
 165
 ctg gtg cac cgc gac atc aag ccc gag aat gtg ctg ctg ttt
 gac cgt 759
 Leu Val His Arg Asp Ile Lys Pro Glu Asn Val Leu Leu Phe Asp Arg
 170 175
 180 185
 gag tgc cgc cgc gtg aag ctg gct gac ttc ggc atg acg
 cgg cgc gta 807
 Glu Cys Arg Arg Val Lys Leu Ala Asp Phe Gly Met Thr Arg Arg Val
 190 195
 200
 ggc tgc cgt gtg aag cga gta agc ggc act ata ccc tac acg
 gcg ccc 855
 Gly Cys Arg Val Lys Arg Val Ser Gly Thr Ile Pro Tyr Thr Ala Pro
 205 210
 215
 gag gtg tgc cag gct ggc cgc gcc gat ggc ttc gcg gtg gac
 acg ggc 903
 Glu Val Cys Gln Ala Gly Arg Ala Asp Gly Phe Ala Val Asp Thr Gly
 220 225
 230
 gtg gat gtg tgg gca ttc ggc gtg ctc atc ttc tgc gtg
 ctc act ggc 951

Val Asp Val Trp Ala Phe Gly Val Leu Ile Phe Cys Val Leu Thr Gly

/11

235

240

245

aac ttc ccg tgg gag gct gcg tca ggt gcc gat gcc ttc
ttc gag gaa 999

Asn Phe Pro Trp Glu Ala Ala Ser Gly Ala Asp Ala Phe Phe Glu Glu

250

255

260

265

ttt gtg cgc tgg cag cgg ggt cgc ctg ccc ggg ctg cca
tcc cag tgg 1047

Phe Val Arg Trp Gln Arg Gly Arg Leu Pro Gly Leu Pro Ser Gln Trp

270

275

280

cga cgc ttt acg gag cct gct cta cgc atg ttc cag cgg
ctt ctg gcg 1095

Arg Arg Phe Thr Glu Pro Ala Leu Arg Met Phe Gln Arg Leu Leu Ala

285

290

295

ctg gag cct gag cgg cgt ggg ccc gcc aag gag gtc ttt cgc
ttc ctc 1143

Leu Glu Pro Glu Arg Arg Gly Pro Ala Lys Glu Val Phe Arg Phe Leu

300

305 3

10

aag cat gag ctc aca tct gag ctg cgg cgg cgg cca tcg cac
cgc gca 1191

Lys His Glu Leu Thr Ser Glu Leu Arg Arg Arg Pro Ser His Arg Ala

315

320

325

cga aag cca cct ggg gac cgc ctg cct ggg ccc ctg cgc ctt
gag gct 1239

Arg Lys Pro Pro Gly Asp Arg Leu Pro Gly Pro Leu Arg Leu Glu Ala

330

335

340

345

cca ggg cca ctc aag cgc act gtg ctc acc gag agt ggc agc
ggc tcg 1287

Pro Gly Pro Leu Lys Arg Thr Val Leu Thr Glu Ser Gly Ser Gly Ser

350

355

360

cgg cct tcc cca ccc agc gta ggg ccc gtg gta ccc gtg cca
gtg cca 1335

Arg Pro Ser Pro Pro Ser Val Gly Pro Val Val Pro Val Pro Val Pro

365

370

375

gtg cca gta ccc gta cct gag gct ggt ctg gct cca ccc gca
ccc ccg 1383

Val Pro Val Pro Val Pro Glu Ala Gly Leu Ala Pro Pro Ala Pro Pro

380

385

390

ggc agg acc gac ggc cgt gcg gac aag agc aaa ggg cag gtg
gta ttg 1431

Gly Arg Thr Asp Gly Arg Ala Asp Lys Ser Lys Gly Gln Val Val Leu

395

400

405

gcc aca gcc atc gag atc tgc gtc tgagccgctg cagcacagct
gttgcgggga 1485

Ala Thr Ala Ile Glu Ile Cys Val

410

415

agccgcgcgc tctaaccctg actagggaca aggagcagcc gc

1527

<210> 2

<211> 417

<212> PRT

<213> Wister Rat

<400> 2

Met Ser Val Gly Cys Pro Glu Pro Glu Pro Leu His Ser Leu Pro Cys

1

5

10

15

Cys Gly Pro Gly Ala Ala Pro Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Leu Leu

20

25

30

Thr Glu Asp Met Gln Ala Leu Thr Leu Arg Thr Leu Ala Ala Ser Asp

35

40

45

Val Thr Lys His Tyr Glu Leu Val Arg Glu Leu Gly Lys Gly Thr Tyr
 50 55
 60 /12
 Gly Lys Val Asp Leu Val Ala Tyr Lys Gly Thr Gly Thr Lys Met Ala
 65 70
 75 80
 Leu Lys Phe Val Asn Lys Ser Lys Thr Lys Leu Lys Asn Phe Leu Arg
 85 90
 95
 Glu Val Ser Ile Thr Asn Ser Leu Ser Ser Ser Pro Phe Ile Ile Lys
 100 105
 110
 Val Phe Asp Val Val Phe Glu Thr Glu Glu Cys Tyr Val Phe Ala Gln
 115 120
 125
 Glu Tyr Ala Pro Ala Gly Asp Leu Phe Asp Ile Ile Pro Pro Gln Val
 130 135
 140
 Gly Leu Pro Glu Asp Thr Val Lys Arg Cys Val Gln Gln Leu Gly Leu
 145 150
 155 160
 Ala Leu Asp Phe Met His Ser Arg Gln Leu Val His Arg Asp Ile Lys
 165 170
 175
 Pro Glu Asn Val Leu Leu Phe Asp Arg Glu Cys Arg Arg Val Lys Leu

	180		185
190			
Ala Asp Phe Gly Met Thr Arg Arg Val Gly Cys Arg Val Lys Arg Val			
	195		200
205			
Ser Gly Thr Ile Pro Tyr Thr Ala Pro Glu Val Cys Gln Ala Gly Arg			
	210		215
220			
Ala Asp Gly Phe Ala Val Asp Thr Gly Val Asp Val Trp Ala Phe Gly			
225			230
235		240	
Val Leu Ile Phe Cys Val Leu Thr Gly Asn Phe Pro Trp Glu Ala Ala			
	245		250
255			
Ser Gly Ala Asp Ala Phe Phe Glu Glu Phe Val Arg Trp Gln Arg Gly			
	260		265
270			
Arg Leu Pro Gly Leu Pro Ser Gln Trp Arg Arg Phe Thr Glu Pro Ala			
	275		280
285			
Leu Arg Met Phe Gln Arg Leu Leu Ala Leu Glu Pro Glu Arg Arg Gly			
290 295 300			
Pro Ala Lys Glu Val Phe Arg Phe Leu Lys His Glu Leu Thr Ser Glu			
305			310
315		320	
Leu Arg Arg Arg Pro Ser His Arg Ala Arg Lys Pro Pro Gly Asp Arg			

325 330
 335
 Leu Pro Gly Pro Leu Arg Leu Glu Ala Pro Gly Pro Leu Lys Arg Thr
 340 345
 350
 Val Leu Thr Glu Ser Gly Ser Gly Ser Arg Pro Ser Pro Pro Ser Val
 355 360
 365
 Gly Pro Val Val Pro Val Pro Val Pro Val Pro Val Pro Val Pro Glu
 370 375
 380
 Ala Gly Leu Ala Pro Pro Ala Pro Pro Gly Arg Thr Asp Gly Arg Ala
 385 390
 395 400
 Asp Lys Ser Lys Gly Gln Val Val Leu Ala Thr Ala Ile Glu Ile Cys
 405 410
 415
 Val
 <210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 /13
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 3

ggaattcayt gygayytnaa rccngaraa

29

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 4

cctcgagncc nacngaccac atrtc

25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 5

cttactcgct tcacacggca gccta

25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :synthetic DNA

<400> 6

tcacggtcaa acagcagcac attct

25

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7

cctcgagtgt gctgctgttt gaccgtgagt gc

32

/14

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8

taggctgccg tgtgaagcga gtaag

25

<210> 9

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 9

gactagtggg cagcgagatc ctcttgctaa cgagaag

37

<210> 10

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 10

ggaattcgcg gctgctcctt gtccctagta cgggtta

37

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 11

tctcgaggat gagcgtgggc tgccctgagc c

31

[0051]

[Sequence listing free text]: Sequence Nos. 3 ~ 11: Synthetic DNA.

File copy

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-60571

(P2000-60571A)

(43) 公開日 平成12年2月29日 (2000.2.29)

(51) Int.Cl.	識別記号	F I	ページ* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47	4 B 0 5 0
16/18		16/18	4 B 0 6 3
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 9/12	4 B 0 6 4
9/12		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 請求項の数25 F D (全 15 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-249064

(22) 出願日 平成10年8月20日 (1998.8.20)

(71) 出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 奈良 清光

東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化
学生命科学研究所内

(72) 発明者 赤迫 優子

東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化
学生命科学研究所内

(74) 代理人 100103997

弁理士 長谷川 曉司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な哺乳類のペプチド及びそれをコードするポリヌクレオチド

(57) 【要約】

【課題】 リン酸化酵素活性を有する新規な哺乳類ペプチドの提供。

【解決手段】 ラット脳の海馬に存在する、糖鎖情報伝達に關与するリン酸化酵素タンパク質の遺伝子をクローニングして、そのDNA配列及びそれより推定されるアミノ酸配列を決定した。該遺伝子を動物細胞中で発現して該タンパク質の生成を確認した。また、該タンパク質に対する抗体を作成した。

【効果】 本発明のタンパク質は、脳に最も多く存在し、胎児期に多く発現していることから、脳の構築に何らかの役割を果たしていると考えられるので、脳神経系疾患の治療・診断等に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：2で表されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは挿入したアミノ酸配列を含有する哺乳類ペプチド。

【請求項2】 配列番号：2で表されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1〜数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは挿入したアミノ酸配列を含有する請求項1記載の哺乳類ペプチド。

【請求項3】 哺乳類がラットである請求項1記載のペプチド。 10

【請求項4】 哺乳類がマウスである請求項1記載のペプチド。

【請求項5】 哺乳類がヒトである請求項1記載のペプチド。

【請求項6】 配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する請求項1または2記載のペプチド。

【請求項7】 リン酸化酵素活性を有する請求項1または2記載のペプチド。

【請求項8】 セリンスレオニンリン酸化酵素活性を有する請求項7記載のペプチド。 20

【請求項9】 プロリンリッチな配列PPXPを有し、SH3ドメインに結合するキナーゼである請求項8記載のペプチド。

【請求項10】 配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするポリヌクレオチドの少なくとも80%の同一性を有する単離ポリヌクレオチド。

【請求項11】 請求項1または2記載のペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド。

【請求項12】 ポリヌクレオチドがDNAである請求項10または11記載のポリヌクレオチド

【請求項13】 配列番号：1の塩基番号205〜1455で表されるDNA配列を有する請求項11記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項14】 遺伝コードの縮重により、配列番号：2のアミノ酸と同じアミノ酸をコードしている単離ポリヌクレオチド。

【請求項15】 配列番号：1で表される塩基配列を有する請求項12記載の単離DNA。

【請求項16】 請求項12記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項17】 請求項16記載の組換えベクターを含む宿主細胞。

【請求項18】 請求項17記載の宿主細胞を培養し、請求項12記載のDNAを発現させて、請求項1または2記載のペプチドを産生させることを特徴とする請求項1または2記載のペプチドの製造法。

【請求項19】 請求項1または2記載のペプチドを含有する医薬。

【請求項20】 請求項11記載のポリヌクレオチドを含有する医薬。

【請求項21】 請求項1または2記載のペプチドに対する抗体。

【請求項22】 モノクローナル抗体である請求項21記載の抗体。

【請求項23】 ポリクローナル抗体である請求項21記載の抗体。

【請求項24】 請求項1または2記載のペプチドの発現に関連した疾病の診断方法であって、該ペプチドの変異体をコードしているポリヌクレオチド中の変異を検出することを特徴とする診断方法。

【請求項25】 請求項1または2記載のペプチドと相互作用し、その活性を阻害または活性化する化合物を同定する方法であって、スクリーニングしようとする化合物が該ペプチドと相互作用する条件下、ペプチドを含む組成物と該化合物とを接触させ、該化合物の相互作用から生じるシグナルの有無を検出して、請求項1または2記載のペプチドの活性を阻害または活性化する化合物を同定する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規な生理活性を有する哺乳類のタンパク質、特にセリンスレオニンリン酸化酵素活性などリン酸化酵素活性を有するペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】脳では、様々なリン酸化酵素が働き、記憶、神経細胞やグリア細胞の増殖・突起伸展・神経回路網の構築等に重要な役割を果たしている。最近、糖鎖の情報伝達にリン酸化が関与していることが明らかになっている。また、これらに関係するリン酸化酵素が異常になると脳腫瘍、痴呆等の病態を示すことが知られている。そのため新しいリン酸化酵素を発見し、それらの性状を調べることによって神経機能を解明したり、神経疾患における病態メカニズムを解明、診断、治療しようとする試みがなされている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、有用な生理活性を有する新規なペプチド、該ペプチドをコードするDNAなどのポリヌクレオチド、該DNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターを含有する宿主、該ペプチドの組換えDNA技術による製造法、該ペプチドに対する抗体、該ペプチドあるいは該ポリヌクレオチドを含有する医薬、該ペプチドをコードしているDNA中の変異を検出する、該ペプチドに関連した疾患の診断法、該ペプチドを活性化または阻害する化合物の同定法に関する。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記した

課題を解決すべく、鋭意検討を行った結果、ラット脳の海馬に存在する、リン酸化酵素の遺伝子をPCR法を用いて増幅後クローニングし、該遺伝子をコードするポリヌクレオチド配列を決定して、それより演繹されるアミノ酸配列を決定するとともに、該遺伝子を発現させて、該タンパク質の生成を確認して、本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち、本発明は、(1)配列番号：2で表されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは挿入したアミノ酸配列を含有する哺乳類ペプチド、(2)配列番号：2で表されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1〜数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは挿入したアミノ酸配列を含有する1項の哺乳類ペプチド、(3)哺乳類がラットである1項記載のペプチド、

【0006】(4)哺乳類がマウスである1項記載のペプチド、(5)哺乳類がヒトである1項記載のペプチド、(6)配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する1または2項記載のペプチド、(7)リン酸化酵素活性を有する1または2項記載のペプチド、(8)セリンスレオニンリン酸化酵素活性を有する7項記載のペプチド、(9)プロリンリッチな配列PPXPを有し、SH3ドメインに結合するキナーゼである8項記載のペプチド、

【0007】(10)配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするポリヌクレオチドの少なくとも80%の同一性を有する単離ポリヌクレオチド、(11)1または2項記載のペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド、(12)ポリヌクレオチドがDNAである10項または11項記載のポリヌクレオチド、(13)配列番号：1の塩基番号205〜1455で表されるDNA配列を有する11項記載のポリヌクレオチド、(14)遺伝コードの縮重により、配列番号：2のアミノ酸と同じアミノ酸をコードしている単離ポリヌクレオチド、

【0008】(15)配列番号：1で表される塩基配列を有する12項記載の単離DNA、(16)12項記載のDNAを含有する組換えベクター、(17)16項記載の組換えベクターを含む宿主細胞、(18)17項記載の宿主細胞を培養し、12項記載のDNAを発現させて、1または2項記載のペプチドを産生させることを特徴とする1または2項記載のペプチドの製造法、(19)1または2項記載のペプチドを含有する医薬、(20)11項記載のポリヌクレオチドを含有する医薬、

【0009】(21)1または2項記載のペプチドに対する抗体、(22)モノクローナル抗体である21項記載の抗体、(23)ポリクローナル抗体である21項記載の抗体、(24)1または2項記載のペプチドの発現に関連した疾病の診断方法であって、該ペプチドの変異体をコードしているポリヌクレオチド中の変異を検出す

ることを特徴とする診断方法、

【0010】(25)1または2項記載のペプチドと相互作用し、その活性を阻害または活性化する化合物を同定する方法であって、スクリーニングしようとする化合物が該ペプチドと相互作用する条件下、ペプチドを含む組成物と該化合物とを接触させ、該化合物の相互作用から生じるシグナルの有無を検出して、1または2項記載のペプチドの活性を阻害または活性化する化合物を同定する方法を提供する。

10 【0011】本発明のペプチドは、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチドである。配列番号：2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチドとは、配列番号：2のアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有し、配列番号：2に記載のペプチドと同様な活性を有する。このような活性としては、例えばセリンスレオニンリン酸化酵素活性などのリン酸化酵素活性（キナーゼ活性）が挙げられる。その活性の程度は、ペプチドのアミノ酸配列によって変わり得るが、そのような生物活性が有用性を有する限りにおいては、アミノ酸配列は変わり得る。

20 【0012】具体的には、本発明のペプチドは、配列番号：2のアミノ酸配列において1〜複数個、好ましくは1〜10個、さらに好ましくは1〜5個、さらには1, 2, 3又は4個のアミノ酸が欠失、置換もしくは挿入したアミノ酸配列を有するペプチドのフラグメント、アナログを包含する。該フラグメントおよびアナログは、本発明のペプチドの機能にとって重要でない部位のアミノ酸を欠失、置換もしくは挿入して得られる。ペプチドの機能にとって重要な部位のアミノ酸は、置換することとはできない。その他、その生物学的活性と関連してペプチド全体の形の保存に関与している部位もアミノ酸の欠失、置換もしくは挿入によって変化させることは不可能である。置換可能なアミノ酸は、同様なサイズあるいは極性を持ったものである。このような例として、脂肪族アミノ酸Ala, Val, Leu及びIle間での相互置換、水酸基を有するSer及びThr間の相互置換、酸性残基を有するAsp及びGlu間での相互置換、アミド残基を有するAsn及びGlnの間の置換、塩基性残基を有するLys及びArgの間の置換、芳香族残基を有するPhe及びTyr間の置換が挙げられる。

40 【0013】本発明のペプチドの前駆体も、上記した生理活性を有する限り本発明のペプチドに包含される。このような前駆体としては、本発明のペプチドのN末端側および（または）C末端側に、1以上のアミノ酸が付加したもの等が挙げられる。さらに、本発明のペプチドは、半減期を延長させるためにポリエチレングリコールに結合させたり、分泌のために分泌配列あるいはリーダー配列に結合させたり、さらには精製の目的で融合ペプ

チドとして産生させることができる。本発明のペプチドあるいはその前駆体の生理学的に許容される酸附加塩も本発明に包含される。このような酸附加塩としては、塩酸、リン酸、硫酸等の無機酸との塩、酢酸、ギ酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、安息香酸、ベンゼンスルホン酸等の有機酸との塩が挙げられる。

【0014】本発明のペプチド及びポリヌクレオチドは、単離された形態にあり、また好ましくは均一の程度にまで精製されている。本発明のポリヌクレオチドは、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするポリヌクレオチド（配列番号：1の塩基番号205～1455）の少なくとも80%の同一性を有するもの及びそれに相補的なものが好ましい。更に、90%同一であるポリヌクレオチドが好ましく、特に95%以上同一のものが最も好ましい。95%以上、好ましくは97%以上同一の配列を有するポリヌクレオチドは、厳密な条件下でも上記配列番号：2のポリヌクレオチドとハイブリダイズする。

【0015】本発明のペプチドの構造的または機能的特性によって特徴づけられるフラグメントも有用である。本発明のペプチドは全長417アミノ酸からなり、セリンスレオニンキナーゼに特徴的な配列およびプロリンリッチな配列PPXP配列を有する、SH3ドメインに結合するキナーゼであるので、このような有用なフラグメントとしては、セリンスレオニンキナーゼに特徴的な配列、プロリンリッチな配列PPXP配列を有するフラグメントが挙げられる。さらに、本発明は、上記したフラグメントをコードするポリヌクレオチドを包含する。このようなポリヌクレオチドフラグメント及び該フラグメントをコードしているポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドは、PCR用のプライマーとしてあるいは本発明のペプチドをコードするDNAを検出するためのプローブとしても有用である。

【0016】

【発明の実施の態様】本発明のペプチドをコードするDNAは、例えばラット脳由来のポリ(A)⁺RNAの逆転写で得られるcDNAライブラリーからクローニングできる。具体的には、本発明のペプチドをコードするDNAの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて、PCR法により上記ラット海馬cDNAライブラリー等から目的とするDNAを増幅し、これをベクター中にサブクローニングする。新規なクローンを選択し、そのDNA配列を決定する。この配列に基づいて合成したプライマーを用いて全長のcDNAをクローニングする。

【0017】その他、適当なベクターに組み込んだDNAから本発明のペプチド（タンパク質）の一部または全領域をコードするDNA断片あるいは合成オリゴヌクレオチドを標識したものをプローブとして、本発明のペ

チドをコードするDNAをクローニングすることができ、細胞からのポリ(A)⁺RNAの調製は、まず全RNAを抽出し、次いで該全RNAからオリゴ(dT)セルロース等のポリ(A)⁺RNA精製用担体を用いて精製する方法等により実施できる。全RNAの調製方法としては、グアニジンチオシアネート・フェノール法、グアニジンチオシアネート・トリフルオロセシウム法、アルカリ蔗糖密度勾配遠心分離法、グアニジンチオシアネートおよび塩化セシウムを用いる方法等が好適である。

10 【0018】上述のようにして得られたポリ(A)⁺RNAを鋳型にして、例えば、6塩基ランダムオリゴヌクレオチドをプライマーとして、逆転写酵素により一本鎖cDNAを合成し、次いでDNAポリメラーゼにより二本鎖cDNAを合成する。得られる約200bpのDNAを制限酵素EcoRI及びXhoIで切断し、pBluescript IISKベクターにサブクローニングし、得られたDNAを大腸菌に形質転換する。大腸菌の形質転換はハナハンの方法(J.Mol. Biol. 166, 557-580)を用いて効率よく実施できる。得られる100個のクローンからプラスミドDNAをminiprepプラスミド精製法(Sambrook等, MOLECULAR CLONING, ALABORATORY MANUAL, 2nd Ed; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) 1.25参照)で精製し、DNA配列を決定すると、新規な1個のクローンが選択される。このクローンの配列に基づいて合成したプライマーを用いて、全長cDNAが合成される。

30 【0019】配列番号：2で表されるアミノ酸配列において、1もしくは数個(1～数個)のアミノ酸が欠失、置換もしくは挿入したアミノ酸配列を含有する本発明の欠失型、置換型及び挿入型変異体をコードするポリヌクレオチドは、配列番号：2で表されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドから公知のin vitro突然変異誘発により容易に合成できる。公知のキット、例えば、MutantTM-K(宝酒造(株))、MutantTM-G(宝酒造(株))を用いて、配列番号：2で表されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは挿入したアミノ酸配列を含有する本発明の欠失型、置換型及び挿入型変異体をコードするポリヌクレオチドを容易に調製できる。また、発現した配列番号：2で表されるアミノ酸配列のペプチドの変異体が有するリン酸酵素活性は容易に検出可能であり、本発明に含まれるペプチドの範囲は容易に決定可能である。

40 【0020】本発明のポリヌクレオチドを含有する組換えベクターは、本発明のペプチドの産生に使用される。本発明のベクターとしては、宿主細胞中でのポリヌクレオチドの維持、増殖または発現に適したものが使用される。本発明のペプチドをコードするクローン化されたD

NAは、そのまま、あるいは制限酵素で消化したり、リンカーに付加してベクター中に挿入される。該DNAは、その5'末端側に翻訳開始コドン(ATG)を有し、また3'末端側に翻訳終止コドン(TAA, TGAまたはTAG)を有する。該DNAは、発現ベクター中のプロモーターの下流に位置する。このようなベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(pBR322, pBR325, pUC12等)、枯草菌由来のプラスミド(pUB110, pC194)、ストレプトミセス属菌由来のプラスミド、サルモネラ属菌由来のプラスミド等のプラスミド、酵母エピソードや宿主染色体エレメント由来のプラスミド(YCp型プラスミド、pYAC型プラスミド等)、λファージなどのバクテリオファージ、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、バキュロウイルスなどのウイルス由来のベクター等が使用されるが、これらのベクターの多くは市販されている。

【0021】組換えベクター中のDNA配列は、適当な発現制御配列(プロモーター)に作動可能なように連結される。このようなプロモーターとしては、ファージλ PLプロモーター、T7プロモーター、大腸菌のlac, trp, lppおよびtacプロモーター、バチルス属菌のSPO1プロモーター、penPプロモーター、酵母のPHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADH1プロモーター、SUC2プロモーター、GAL4プロモーター、Mfαプロモーター、昆虫細胞の多角体プロモーター、P10プロモーター、動物細胞用のSV40初期及び後期プロモーター、レトロウイルスのLTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーター、メタロチオネインプロモーター、植物細胞用の35Sプロモーター、イネアクチン遺伝子プロモーター等が挙げられる。組換えベクターは、転写されるDNA領域、転写開始及び転写終結のシグナル配列と1以上の遺伝子とを含む。

【0022】一般に、発現ベクターは、リプレッサー結合部位及びエンハンサーなどにより作動する発現制御領域を含む。その他、発現ベクターは、選択マーカーを含有する。好適なマーカーは真核細胞用のジヒドロ葉酸レダクターゼ(dhfr)遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、細菌用のテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性遺伝子等である。dhfr遺伝子は、メソトレキセート耐性を形質転換細胞に付与し、また、ネオマイシン耐性遺伝子は、G418耐性を形質転換細胞に付与する。dhfr遺伝子欠損CHO細胞を宿主とし、dhfr遺伝子を選択マーカーとする場合には、チミジンを含まない培地中で形質転換体を選択できる。この場合、メソトレキセート(MTX)濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、dhfr遺伝子と同時に本発明のペプチドをコードするDNAが細胞内で増幅され、高発現のCHO(dhfr-)細胞が得られる。

【0023】本発明の組換えベクターは、必要に応じて

て、シグナル配列をペプチドのN末端側に付加するように構築される。このようなシグナル配列は、大腸菌宿主の場合には、PhoA, OmpA等のシグナル配列であり、酵母宿主の場合には、Mfα, SUC2シグナル配列等であり、動物細胞宿主の場合には、α-インターフェロンシグナル配列等である。本発明は、また上記組換えベクターを含む宿主細胞に関する。宿主細胞は、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、アスペルギウス属菌などの真核細胞、細菌細胞などの原核細胞である。リン酸カルシウムトランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染その他の方法により本発明の組換えベクターは宿主細胞に導入される。

【0024】上記したプロモーターの制御下、上記した哺乳動物細胞、酵母、細菌等の宿主において本発明のペプチドを発現できる。原核宿主の例は、大腸菌、枯草菌、サルモネラ菌、シュードモナス、ストレプトミセス、スタフィロコッカス等である。酵母としては、サッカロマイセス・セレビシエ、シゾサッカロマイセス・ボンベ、ヒキア・バストリス等が挙げられる。

【0025】形質転換した原核宿主は増殖され、誘導可能なプロモーターを含むベクターの場合には、温度あるいは化学誘導物質により誘導し、該細胞を炭素源(グルコース、デキストラン、可溶性澱粉等)、窒素源(アンモニウム塩、硝酸塩類、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕等)及び無機物(塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム等)を含有する液体培地中、適当なpH(pH約5~8)で適当な時間(約3~24時間)培養する。適当な培養温度は、大腸菌については、約14~43℃、バチルス属菌の場合には、約30~40℃である。培養後、細胞を物理的あるいは化学的方法で破壊し、得られる粗抽物質から、本発明のペプチドが精製される。

【0026】形質転換された酵母は、最小培地等の培地中で、pH約5~8、温度約20~35℃で約24~72時間培養される。昆虫細胞としては、AcNPV(Autographa californica NPV)をウイルスとする場合には、Sf細胞、MG1細胞等が使用され、またカイコ多核体病ウイルス(BmPV)をウイルスとする場合には、カイコ幼虫及びカイコ培養細胞(BM-N細胞)等が使用される。カイコ細胞は、10%熱不活性化ウシ胎仔血清を含むTC-10培地等を用い、約27℃でコンフルエントにした後、継代培養される。

【0027】哺乳動物細胞の例は、COS-7細胞、マウスAtT-20細胞、ラットGH3細胞、ラットMtT細胞、マウスMIN6細胞、Vero細胞、C127細胞、CHO細胞、dhfr遺伝子欠損CHO細胞、HeLa細胞、L細胞、BHK細胞、BALB3T3細胞、293細胞、ボウズ黒色腫細胞等である。哺乳動物細胞発現ベクターは、複製起点、プロモーター(上記SV

40初期及び後期プロモータ、レトロウイルスのLTRプロモータ、CMVプロモータ、HSV-TKプロモータ、メタロチオネインプロモータ等)、エンハンサー(SV40エンハンサー、アデノウイルスエンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーター等)、選択マーカー(上記dhfr遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等)、リボソーム結合部位、ポリアデニル化部位(SV40ポリアデニル化部位等)、スプライスドナー及びアクセプター部位(SV40スプライス部位由来のDNA配列)、転写終結配列及び5'非転写配列を含む。

【0028】このようなベクターとして、プラスミドベクター、1本鎖もしくは2本鎖ファージベクター、1本鎖もしくは2本鎖のRNAもしくはDNAウイルスベクター等が使用される。形質転換哺乳動物細胞の培養には、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地、DMEM培地、RPMI1640培地等が使用され、pH約6~8、温度約30~40℃で約15~72時間培養が行われる。

【0029】植物細胞に本発明のペプチドをコードする遺伝子を導入するには、*Agrobacterium tumefaciens*に存在するTiプラスミドが使用される。外来の遺伝子は、TiプラスミドのT-DNAの両末端の25bpの繰り返し配列内に挿入される。

*A. rhizogenes*のRiプラスミドも同様に使用できる。T-DNAが植物細胞内に導入される際には、vir領域と呼ばれる遺伝子群が重要である。活性化されたvir遺伝子によってT-DNAから一本鎖DNA(T-ストランド)が生じ、該遺伝子は植物細胞内の染色体に組み込まれる。目的の遺伝子は、共存組み込みによりTiプラスミドに導入できる。その他、T-DNAとvir領域とが別々のプラスミド上に存在しているバイナリー方式により、アグロバクテリウムにTiプラスミドを導入できる。次いで、目的遺伝子を含むアグロバクテリウムを植物に感染させ、該遺伝子を植物に導入する。

【0030】哺乳動物細胞を宿主とした場合、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ等により本発明のペプチドを組換え細胞培養物から回収、精製できる。本発明のペプチドはグリコシル化されていなくてもよい。また、宿主次第では、N末端にメチオニンを有するペプチドが得られる。上記した組換えDNA技術による、本発明のペプチドの産生についての詳細は、Sambrook等、MOLECULAR CLONING, ALABORATORY MANUAL, 2nd Ed; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)に記載されている。

【0031】本発明のペプチドに対するモノクローナル

抗体産生のために、本発明のペプチドは、担体及び希釈剤とともにマウス及びラット等の温血動物に投与される。抗体産生能を高めるために、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを同時に投与するのが好ましい。通常2~6週毎に1回ずつ、合計2回から10回程度ペプチドが投与される。モノクローナル抗体産生細胞作成に際しては、抗原を免疫した温血動物から抗体価の認められた個体を選択し、最終免疫の2~5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることによりモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製できる。上記した細胞融合操作は、Kohler and Milstein, Nature, 256, 495 (1975)に従って実施できる。融合促進剤としては、ポリエチレングリコール(PEG)が好ましく、また骨髓腫細胞としては、P3U1が好ましい。使用される抗体産生脾臓細胞数と骨髓腫細胞数との比は、1:1~20:1の範囲が好ましく、PEGは、10~80%程度の濃度で添加され、30~37℃で1~10分間インキュベートすることにより効率よく融合細胞が得られる。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング及びモノクローナル抗体の精製は公知の方法に従って実施できる。

【0032】本発明のモノクローナル抗体には、キメラ抗体、1本鎖抗体、ヒト化抗体、Fabフラグメントなども含まれる。また、ポリクローナル抗体も公知の方法に従って作成できる。すなわち、本発明のペプチドとキャリアタンパク質との複合体を作成し、上記したモノクローナル抗体の場合と同様にして温血動物を免疫し、公知の方法で抗体を分離精製する。本発明のペプチドは、脳内での情報伝達に関与すると考えられるので、脳神経系疾患の治療に使用し得る。また、本発明のペプチドを活性化する物質は、神経活動の維持、活性化に有用であると考えられる。

【0033】本発明のペプチドを活性化する化合物は、以下のようにして同定できる。すなわち、スクリーニングしようとする化合物と本発明のペプチドとが相互作用できる条件下、該候補化合物と本発明のペプチドとの相互作用に応じて検出可能なシグナルを提供できる第2の成分の存在下、該候補化合物と本発明のペプチドとを相互作用させて、該相互作用から生じるシグナルの有無を検出して、該候補化合物が本発明のペプチドの活性を阻害または活性化するかを決定する。

【0034】治療上有効量の本発明のペプチドを、該ペプチドを必要としている個体に投与して該個体を治療することができる。

【0035】また、本発明のペプチドの活性または発現を阻害するアンタゴニストの有効量を、該ペプチドの阻害を必要としている個体に投与することにより該個体を治療することができる。このようなアンタゴニストとしては、本発明のペプチドに対するモノクローナル抗体あ

11

るいはポリクローナル抗体、さらには本発明のペプチドの遺伝子の発現を阻害するオリゴヌクレオチドであるアンチセンスDNAまたはアンチセンスRNAあるいは生体内でアンチセンスRNAを生成するDNA構築物等を使用できる。

【0036】本発明のペプチドは、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤等として経口的に投与される。ペプチド医薬は、通常胃や小腸で分解されるので、経口投与の場合、これら臓器での分解を避けるための薬物運搬システムの使用が好ましい。また、本発明のペプチドは、水その他の薬剤として許容される液との無菌性溶液、懸濁剤などの注射剤等として非経口的に投与される。

【0037】本発明の医薬には、公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤等が含まれる。また、錠剤、カプセル剤などに添加される結合剤、膨化剤、潤滑剤、甘味剤、香味剤等も公知のものを使用できる。本発明のペプチドの投与量は、患者の状態、患者の年齢、同時投与の有無、投与経路等によって異なるが、通常のペプチド医薬の投与量、即ち10 μ g/kg体重～8mg/kg体重の範囲にあると考えられる。

【0038】疾病にかかっている個体及び疾病にかかっていない個体との間のcDNAまたはゲノム配列の相違を決定することにより、本願発明のペプチドの発現に関連した疾病を診断できる。すなわち、疾病にかかっている個体において観察される変異が、正常個体においては観察されない場合には、その変異は本発明のペプチドに関連した疾病の原因である可能性がある。また、上記したcDNAまたはmRNAの遺伝子異常を検出できるので、該ポリヌクレオチドの損傷、変異あるいは発現の低下あるいは増加、さらには発現過剰に由来する疾病を診断するための遺伝子診断に本発明のポリヌクレオチドあるいはその断片は有用である。本発明のポリヌクレオチドを治療薬あるいは予防薬として使用するに際しては、該ポリヌクレオチドを単独で、あるいは公知のレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター等に挿入し、公知の方法により投与することができる。

【0039】

【実施例】以下に、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明は、その要旨を越えない限りこれらの実施例に限定されるものではない。特記しない限り、下記実施例の方法は、上記したSambrookらの実験マニュアルに記載された標準的な方法によって実施された。

【0040】実施例1 ラットPKS遺伝子のクローニング

本発明のペプチド（以下、「PKS」と略す。）は、配列表の配列番号：2に示すアミノ酸配列を有し、配列表の配列番号：1に示すDNA配列によってコードされる。PKSの遺伝子は、例えば、以下に示すように、遺

12

伝子工学を用いてラット脳等の組織から得られる。

【0041】具体的には、まず、ラットより脳を取り出し、10倍量のグアニジンチオシアネートを含む溶液（4Mグアニジンチオシアネート、0.1Mトリス-塩酸、pH 7.5）中で、ポリトロンホモジナイザーを用い、ホモジナイズした。18Gの注射針のついた注射器を用いDNAを切断した後、終濃度が0.5%になるようにラウリルサルコシン酸ナトリウムを加え、CsCl-EDTA溶液（5.7M CsCl、0.5MEDTA、pH 7.5）の上に上層し、日立超遠心機RPS40ローター、25000 rpm、20度にて24時間遠心した。遠心チューブの底に沈殿したRNAを5ml程度のTES溶液（0.1% SDS、10mMトリス、pH 7.5、1mM EDTA）で溶解し、回収する。この液にクロロホルム/イソブタノール（=4:1）を等量加え夾雑物を除いた後、1/10量の3M酢酸ナトリウム（pH 5.2）及び2.5倍量のエタノールを加えて、RNAを沈殿させた。沈殿したRNAを遠心によって回収し、70%エタノールによって塩を除き、室温で乾燥させることによって、全RNAが得られた。得られた全RNAを1mlのカラム負荷緩衝液（20mMトリス-塩酸、pH 7.6、0.5M NaCl、1mMEDTA、0.1%ラウリルサルコシン酸ナトリウム）に溶かし、カラム負荷緩衝液で平衡化したオリゴdTセファロースにかけ、夾雑物を除くため10倍量のカラム負荷緩衝液で洗浄した後、溶出緩衝液（10mMトリス-塩酸、pH 7.6、1mMEDTA、0.05% SDS）で溶出するとmRNAが得られた。上記のようにして得られたmRNAの精製は、例えばInvitrogen社のFastTrack 2.0mRNA単離キットなどを用いても行うことができる。

【0042】得られたmRNA 1 μ gを11 μ lの水に溶かし、6塩基ランダムオリゴヌクレオチド（50ng/ μ l）を1 μ l加えて70℃、10分間加熱した後、氷上で1分間冷却し、10x第1鎖緩衝液（first strand buffer）（200mMトリス-塩酸、pH 8.4、500mMKCl）2 μ l、25mMMgCl₂ 2 μ l、0.1Mジチオトレイトール 2 μ l、10mMdNTP混合物（dATP、dGTP、dCTP、dTTP各10mM）1 μ lおよび逆転写酵素（GIBCO BRL社SuperScript II、200ユニット/ μ l）1 μ lを加え、25℃において10分間、42℃において50分間反応させるとラット海馬cDNAが合成された。上記したcDNAの合成は、Life Technologies社のキット（SuperScript Preamplication System for first strand cDNA Synthesis Kit）を用いて行った。

【0043】得られたcDNAを鋳型にして、配列番号3および4に示す合成DNAを用いて、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション（PCR）法により、PKSのcDNAが得られた。まず、上記のようにして得られた

13

ラット脳cDNA 1 μ l、200 mM トリス-塩酸 (pH 8.4, 500 mM KCl) 2.5 μ l、25 mM MgCl₂ 1.5 μ l、10 mM dNTP 混合物 (dATP, dGTP, dCTP, dTTP 各 10 mM) 0.5 μ l、上記配列番号3及び4の合成DNA (100 pmol/ μ l) 各 0.5 μ l、Perkin Elmer社のAmpli Taq DNAポリメラーゼ (5 ユニット/ μ l) 0.25 μ l および水 18.25 μ l を加え、94℃ 80秒、55℃ 150秒、72℃ 180秒からなるサイクルを35サイクル繰り返すと、約200 bpのDNAが増幅された。このDNAを制限酵素EcoRI及びXhoIで切断した後、アガロースゲル電気泳動で分離し、制限酵素EcoRI及びXhoIで切断したpBluescript II SK-ベクターにサブクローニングした。得られたDNAを大腸菌XL1-Blue MRF'株にトランスフォーメーションし、クローンを100個得た。このクローンより、プラスミドDNAをminiprepプラスミド精製法 (プラスミドDNAの小規模調製法) で調製し、サンガー法によりDNA配列を決定したところ、うち1つに新規な配列が含まれていた。その配列を基に配列番号5から9に示すような合成DNAを作成し、Clontech社のMarathon RACEキットを用いて、配列番号5と6に示す合成DNAを順次使用して5'-RACE (cDNA末端の急速増幅) を行い、また配列番号7と8に示す合成DNAを順次使用して3'-RACEを行い、オープンリーディングフレーム全長をカバーするcDNA断片を得て、その塩基配列を決定したところ、配列番号1に示すような塩基配列が決定された。

【0044】PKSのcDNAは、以下のように、得られた塩基配列を基にして合成した配列番号9及び10に示すような合成DNAを用いても、簡単に得ることができた。すなわち、タカラPCRキットを用い、10 X LA PCR 緩衝液 5 μ l / 50 μ l、dNTP 各 400 μ M、合成DNA 各 0.2 μ M、TAKARA LA Taq 1.25 U / 25 μ l、ラット海馬cDNA 1 μ l (約30 ng) の条件下で、PCR反応 (94℃、20秒、72℃、3分なるサイクルを5サイクル、94℃、20秒、70℃、3分からなるサイクルを5サイクルおよび94℃、20秒、68℃、3分からなるサイクルを20サイクル) を行くと、1500 bpのPKSのcDNAが得られた。得られたPKSのcDNA 50 ngを制限酵素SpeI及びEcoRIにより切断し、同じくSpeI及びEcoRIにより切断したベクター (例えばストラタジーン社のpBluescript II SK-) 15 ngとTAKARA連結キット (Ligation Kit ver.2) を用いて連結した。得られたDNAに水を加えて100 μ lとし、7.5 M 酢酸アンモニア1/2量、エタノール2倍量を加えてエタノール沈殿し、連結したDNAを精製後、2 μ lの水に溶解し、20 μ lの水に

14

懸濁した大腸菌XL1-Blue MRF'株へエレクトロポレーション法 (0.1 cm gap, 300 ohm, 1.75 kV, 25 μ FD, BIORad Gene Pulser II) で導入し、50 μ g/mlのアンピシリンを含むLB-Agar培地に播くと、PKSのcDNAが連結したプラスミドDNAを含有する大腸菌が生育した。この大腸菌よりプラスミドDNAをminiprep法で精製すると、PKSのcDNAを含むプラスミドベクターが得られた。このDNAの配列をサンガー法により決定した。

【0045】さらにPKSの動物細胞における発現系を構築した。上記のようにして得られたPKSのcDNAを鋳型とし、配列番号10および11に示す合成DNAを用いて、PCR反応を行い、得られたDNA断片を制限酵素XhoI及びEcoRIにより切断して、動物細胞用発現ベクターpEGFP-C2 (クローンテック社) に挿入することによりPKS動物細胞発現ベクターpEGFP-C2 PKSを作製した。得られたDNAを精製後、精製DNA 20 μ gをHeBS (20 mM Hepes, pH 7.05, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na₂HPO₄, 6 mM デキストロース) 800 μ lに懸濁したCHOP細胞3 x 10⁶ 個と混合して、エレクトロポレーション法 (0.4 cm gap, 0.38 kV, 960 μ FD, BioRad Gene Pulser II) により、上記DNAをCHOP細胞に導入した。同細胞を α MEMにウシ胎児血清10%を加えた培地で2日間培養すると、細胞内に本発明のペプチドがクラゲ緑色蛍光タンパク質 (GFP) との融合蛋白として発現した。発現したタンパク質は、抗GFP抗体及び抗PKS抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、75 kDa (PKS約50 kDa + GFP約27 kDa) の位置に確認された。

【0046】上記したmRNA、cDNA及びDNAの合成、PCR、DNAの組み換え等の技術は、上記したSambrook等の実験室マニュアルに記載されている。PKSのmRNAの量を調べるために、以下のようにしてノーザンブロットを行った。得られたcDNAをランダムプライマーラベリング法によって32 Pラベルし、マウスの脳、心臓、脾臓、肺、肝臓、骨格筋臓、精巣からそれぞれmRNAを調製し、ノーザンブロット解析をしたところ、PKSのmRNAは脳、心臓に最も多く、肝臓、腎臓、精巣、肺にも発現していた。このため、PKSはこれらの臓器で特異的な生理作用を有していると推察される。また、ラット脳において胎児期14日、胎児期18日、生後7日、生後15日、生後10週でのPKSの発現量をノーザンブロット解析で比較したところ、胎児期18日でPKSのmRNA量が最大になっていた。この時期は脳の発生段階において、神経細胞の増殖、分化、神経突起の伸展の時期に相当し、PKSはこれらの段階でなんらかの機能を有している可能性が示された。一方、以下のようにしてPKSに対する抗体を作製した。配列番号2の398-417番目の部分に相当す

る20残基のペプチドを合成し、Keyhole Limpet Hemocyanineにコンジュゲートして、ウサギに免疫した。初回免疫は0.4 mgをフロイント完全アジュバントと共にを行い、その後、1カ月ごとに2回目、3回目は0.4mgをフロイント不完全アジュバントと共に皮下に注射した。免疫して10日後に血液を採取し、抗PKS血清を得た。この抗血清を用いて、ラット脳のホモジネートのウェスタンブロットを行ったところ、約50 kDaの分子量を持つ蛋白質に抗PKS血清が特異的に結合したため、PKSはラットの生体内において約50 kDaの分子量を持つことが分かった。この分子量は配列番号2によって示されペプチドの分子量と一致していた。

【0047】本発明のペプチドは、配列番号2の60番目のGly, 62番目のGly, 65番目のGly, 71番目のAla, 73番目のLys, 172-170番目のHis-Asn, 194-196番目のAsp-Glu, 235-240番目のAsp-Glyにセリンスレオニンリン酸化酵素の共通配列を持っていることから、セリンスレオニンリン酸化酵素であると考えられる。またマウスのPKS遺伝子の配列は、配列番号2の254番目のGluがLysに、340番目のProがSerに、400番目のAlaがThrに変化しているだけなので、セリンスレオニンリン酸化酵素活性を持ち、かつ、配列番号2に示すような配列を持つペプチド及びそれをコードするDNA、及びそれらの配列の1以上の欠失、置換、挿入した配列を持つ哺乳類のペプチド及びこれをコードするDNAも本発明の範囲に含まれる。

【0048】本発明の蛋白質はその配列からセリンスレ*

*オニンリン酸化酵素であると考えられるので、リン酸化される基質の検索、リン酸化酵素活性に対する阻害剤及び活性化剤の開発などを行うことによって医薬への応用が期待される。また、mRNAの発現は、脳、心臓に最も多く、肝臓、腎臓、精巣、肺にも見られるため、これらの組織を原発とする病態に対する、病因の解明、診断、治療などに利用されることが期待される。また、本発明のペプチドは、中枢神経を調節する作用を有することが期待され、神経学的機能関連疾患の治療にも使用し得る。

【0049】

【発明の効果】 本願発明のペプチドは、海馬に発現する、糖鎖情報伝達に関与するリン酸化酵素である。この酵素は、セリンスレオニンキナーゼに特徴的な配列およびアロリンリッチな配列とPPXP配列を有するのでSH3ドメインに結合するキナーゼであると考えられ、このペプチドをSH3-binding type protein kinase (PKS)と名付けた。ノーザンブロット解析の結果、PKSは、脳に最も多く存在し、胎児期に多く発現していることから、本願発明のペプチドは脳の構築において何らかの役割を果たしていると考えられる。従って、本発明のペプチドは、脳神経系疾患、神経学的機能関連疾患の治療・診断に有用であると考えられる。また、本発明のペプチドを活性化する物質は、神経活動の維持、活性化に有用であると考えられる。

【0050】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Chemical Corporation

<120> Novel mammalian peptide and polynucleotide coding therefor

<130> P98-0440

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1527

<212> DNA

<213> Wister Rat

<220>

<221> CDS

<222> (205)..(1455)

17

<400> 1

acagcgagat cctcttgcta acgagaagcc gcgggcgccc caaagcctcg ggacccgggc 60
 gaccaaaacc cttagcagc ctttcgctc cctgctcatg gtggtggtg tgccctgagc 120
 cctctcggg ccgggcagac gaagaccgac acggcgccca gggccctgc cggcggtcc 180
 ccgcgcccc agccagga gaag atg agc gtg ggc tgc cct gag cct gaa 231

Met Ser Val Gly Cys Pro Glu Pro Glu

1

5

ccg ctc cac tcc ctg cct tgc tgt ggg ccg ggg gcc gcc cct gta cct 279
 Pro Leu His Ser Leu Pro Cys Cys Gly Pro Gly Ala Ala Pro Val Pro
 10 15 20 25

ggt gca ggt gtg ccc ctc ctc aca gaa gac atg caa gcc ctg acc ctg 327
 Gly Ala Gly Val Pro Leu Leu Thr Glu Asp Met Gln Ala Leu Thr Leu

30

35

40

cgc aca ctg gct gcc agc gac gtc acc aag cac tac gag ctc gtg cgg 375
 Arg Thr Leu Ala Ala Ser Asp Val Thr Lys His Tyr Glu Leu Val Arg

45

50

55

gag ctg ggt aaa ggg acc tac ggg aag gtc gac ctg gtg gct tac aag 423
 Glu Leu Gly Lys Gly Thr Tyr Gly Lys Val Asp Leu Val Ala Tyr Lys

60

65

70

ggc aca ggc act aaa atg gcc ctg aaa ttt gtg aat aag agt aag acc 471
 Gly Thr Gly Thr Lys Met Ala Leu Lys Phe Val Asn Lys Ser Lys Thr

75

80

85

aag ctg aag aac ttc ctg cgt gag gtg agc atc acc aac agc ctg tcg 519
 Lys Leu Lys Asn Phe Leu Arg Glu Val Ser Ile Thr Asn Ser Leu Ser
 90 95 100 105

tct agc ccc ttc atc atc aag gtc ttc gac gtg gtc ttc gag acg gag 567
 Ser Ser Pro Phe Ile Ile Lys Val Phe Asp Val Val Phe Glu Thr Glu

110

115

120

gag tgc tat gtc ttt gct cag gag tat gca cct gct ggg gac ctg ttt 615
 Glu Cys Tyr Val Phe Ala Gln Glu Tyr Ala Pro Ala Gly Asp Leu Phe

125

130

135

gac atc atc cct cct cag gtg ggg ctc ccg gag gac acg gtg aag cgc 663
 Asp Ile Ile Pro Pro Gln Val Gly Leu Pro Glu Asp Thr Val Lys Arg

140

145

150

tgt gtg cag cag ctg ggg ctg gca ctg gac ttc atg cat agc agg cag 711
 Cys Val Gln Gln Leu Gly Leu Ala Leu Asp Phe Met His Ser Arg Gln

155

160

165

ctg gtg cac cgc gac atc aag ccc gag aat gtg ctg ctg ttt gac cgt 759
 Leu Val His Arg Asp Ile Lys Pro Glu Asn Val Leu Leu Phe Asp Arg

170

175

180

185

gag tgc cgc cgc gtg aag ctg gct gac ttc ggc atg acg cgg cgc gta 807
 Glu Cys Arg Arg Val Lys Leu Ala Asp Phe Gly Met Thr Arg Arg Val

190

195

200

ggc tgc cgt gtg aag cga gta agc ggc act ata ccc tac acg gcg ccc 855
 Gly Cys Arg Val Lys Arg Val Ser Gly Thr Ile Pro Tyr Thr Ala Pro

205

210

215

gag gtg tgc cag gct ggc cgc gcc gat ggc ttc gcg gtg gac acg ggc 903
 Glu Val Cys Gln Ala Gly Arg Ala Asp Gly Phe Ala Val Asp Thr Gly

220

225

230

gtg gat gtg tgg gca ttc ggc gtg ctc atc ttc tgc gtg ctc act ggc 951

19

Val Asp Val Trp Ala Phe Gly Val Leu Ile Phe Cys Val Leu Thr Gly
 235 240 245
 aac ttc ccg tgg gag gct gcg tca ggt gcc gat gcc ttc ttc gag gaa 999
 Asn Phe Pro Trp Glu Ala Ala Ser Gly Ala Asp Ala Phe Phe Glu Glu
 250 255 260 265
 ttt gtg cgc tgg cag cgg ggt cgc ctg ccc ggg ctg cca tcc cag tgg 1047
 Phe Val Arg Trp Gln Arg Gly Arg Leu Pro Gly Leu Pro Ser Gln Trp
 270 275 280
 cga cgc ttt acg gag cct gct cta cgc atg ttc cag cgg ctt ctg gcg 1095
 Arg Arg Phe Thr Glu Pro Ala Leu Arg Met Phe Gln Arg Leu Leu Ala
 285 290 295
 ctg gag cct gag cgg cgt ggg ccc gcc aag gag gtc ttt cgc ttc ctc 1143
 Leu Glu Pro Glu Arg Arg Gly Pro Ala Lys Glu Val Phe Arg Phe Leu
 300 305 310
 aag cat gag ctc aca tct gag ctg cgg cgg cgg cca tgc cac cgc gca 1191
 Lys His Glu Leu Thr Ser Glu Leu Arg Arg Arg Pro Ser His Arg Ala
 315 320 325
 cga aag cca cct ggg gac cgc ctg cct ggg ccc ctg cgc ctt gag gct 1239
 Arg Lys Pro Pro Gly Asp Arg Leu Pro Gly Pro Leu Arg Leu Glu Ala
 330 335 340 345
 cca ggg cca ctc aag cgc act gtg ctc acc gag agt ggc agc ggc tgc 1287
 Pro Gly Pro Leu Lys Arg Thr Val Leu Thr Glu Ser Gly Ser Gly Ser
 350 355 360
 cgg cct tcc cca ccc agc gta ggg ccc gtg gta ccc gtg cca gtg cca 1335
 Arg Pro Ser Pro Pro Ser Val Gly Pro Val Val Pro Val Pro Val Pro
 365 370 375
 gtg cca gta ccc gta cct gag gct ggt ctg gct cca ccc gca ccc ccg 1383
 Val Pro Val Pro Val Pro Glu Ala Gly Leu Ala Pro Pro Ala Pro Pro
 380 385 390
 ggc agg acc gac ggc cgt gcg gac aag agc aaa ggg cag gtg gta ttg 1431
 Gly Arg Thr Asp Gly Arg Ala Asp Lys Ser Lys Gly Gln Val Val Leu
 395 400 405
 gcc aca gcc atc gag atc tgc gtc tgagccgctg cagcacagct gttgcgggga 1485
 Ala Thr Ala Ile Glu Ile Cys Val
 410 415
 agccgcgcgc tctaaccgt actagggaca aggagcagcc gc 1527

<210> 2

<211> 417

<212> PRT

<213> Wister Rat

<400> 2

Met Ser Val Gly Cys Pro Glu Pro Glu Pro Leu His Ser Leu Pro Cys
 1 5 10 15
 Cys Gly Pro Gly Ala Ala Pro Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Leu Leu
 20 25 30
 Thr Glu Asp Met Gln Ala Leu Thr Leu Arg Thr Leu Ala Ala Ser Asp
 35 40 45
 Val Thr Lys His Tyr Glu Leu Val Arg Glu Leu Gly Lys Gly Thr Tyr

21
 50 55 60
 Gly Lys Val Asp Leu Val Ala Tyr Lys Gly Thr Gly Thr Lys Met Ala
 65 70 75 80
 Leu Lys Phe Val Asn Lys Ser Lys Thr Lys Leu Lys Asn Phe Leu Arg
 85 90 95
 Glu Val Ser Ile Thr Asn Ser Leu Ser Ser Ser Pro Phe Ile Ile Lys
 100 105 110
 Val Phe Asp Val Val Phe Glu Thr Glu Glu Cys Tyr Val Phe Ala Gln
 115 120 125
 Glu Tyr Ala Pro Ala Gly Asp Leu Phe Asp Ile Ile Pro Pro Gln Val
 130 135 140
 Gly Leu Pro Glu Asp Thr Val Lys Arg Cys Val Gln Gln Leu Gly Leu
 145 150 155 160
 Ala Leu Asp Phe Met His Ser Arg Gln Leu Val His Arg Asp Ile Lys
 165 170 175
 Pro Glu Asn Val Leu Leu Phe Asp Arg Glu Cys Arg Arg Val Lys Leu
 180 185 190
 Ala Asp Phe Gly Met Thr Arg Arg Val Gly Cys Arg Val Lys Arg Val
 195 200 205
 Ser Gly Thr Ile Pro Tyr Thr Ala Pro Glu Val Cys Gln Ala Gly Arg
 210 215 220
 Ala Asp Gly Phe Ala Val Asp Thr Gly Val Asp Val Trp Ala Phe Gly
 225 230 235 240
 Val Leu Ile Phe Cys Val Leu Thr Gly Asn Phe Pro Trp Glu Ala Ala
 245 250 255
 Ser Gly Ala Asp Ala Phe Phe Glu Glu Phe Val Arg Trp Gln Arg Gly
 260 265 270
 Arg Leu Pro Gly Leu Pro Ser Gln Trp Arg Arg Phe Thr Glu Pro Ala
 275 280 285
 Leu Arg Met Phe Gln Arg Leu Leu Ala Leu Glu Pro Glu Arg Arg Gly
 290 295 300
 Pro Ala Lys Glu Val Phe Arg Phe Leu Lys His Glu Leu Thr Ser Glu
 305 310 315 320
 Leu Arg Arg Arg Pro Ser His Arg Ala Arg Lys Pro Pro Gly Asp Arg
 325 330 335
 Leu Pro Gly Pro Leu Arg Leu Glu Ala Pro Gly Pro Leu Lys Arg Thr
 340 345 350
 Val Leu Thr Glu Ser Gly Ser Gly Ser Arg Pro Ser Pro Pro Ser Val
 355 360 365
 Gly Pro Val Val Pro Val Pro Val Pro Val Pro Val Pro Glu
 370 375 380
 Ala Gly Leu Ala Pro Pro Ala Pro Pro Gly Arg Thr Asp Gly Arg Ala
 385 390 395 400
 Asp Lys Ser Lys Gly Gln Val Val Leu Ala Thr Ala Ile Glu Ile Cys
 405 410 415
 Val

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

23

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 3

ggaattcayt gygayytnaa rcngaraa

29

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 4

cctcgagncc nacngaccac atrtc

25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 5

cttactcgct tcacaggca gccta

25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 6

tcacgtcaa acagcagcac attct

25

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 7

25

26

cctcgagtgt gctgctgttt gaccgtgagt gc

32

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 8

taggctgccg tgtgaagcga gtaag

25

<210> 9

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 9

gactagtga cagcgagatc ctcttgctaa cgagaag

37

<210> 10

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 10

ggaattcgcg gctgctcctt gtcctagta cgggtta

37

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 11

tctcgaggat gagcgtgggc tgccctgagc c

31

【0051】

* A

【配列表フリーテキスト】配列番号3-11:合成DN*

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁷)	識別記号	F I	ターム(参考)
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
// C 1 2 P 21/08		C 1 2 N 5/00	B
(C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:91)			
(C 1 2 N 9/12			
C 1 2 R 1:91)			
(72)発明者 永井 克孝		F ターム(参考)	4B024 AA01 AA11 AA12 BA10 BA43
東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化			BA44 CA04 CA05 CA07 DA02
学生命科学研究所内			HA01
			4B050 CC03 DD11 LL01
			4B063 QA01 QA13 QA18 QQ03 QQ27
			QR07 QR24 QS31 QS36
			4B064 AG01 AG26 AG27 CA10 CA19
			CC24 DA01 DA13
			4B065 AA90X AA91Y AA93Y AB01
			BA03 CA29 CA44 CA46
			4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
			BA72 CA40 DA75 DA76 DA89
			EA21 EA50 FA74